



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

EVOLUÇÃO DO CONTROLO REPRODUTIVO EQUINO EM PORTUGAL E AS SUAS
REPERCUSSÕES NA PRODUTIVIDADE

ANA BÁRBARA BATISTA DE ABEL TRAÇA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

ORIENTADOR

Doutor José Carlos Migueis Nunes Duarte

Presidente

Doutor Luís Lopes da Costa

CO-ORIENTADOR

Vogais

Doutor Rui Manuel V. Horta Caldeira

Doutor Rui Manuel Vasconcelos Horta Caldeira

Doutor Rui José Branquinho de Bessa

Doutor José Carlos Migueis Nunes Duarte

2010

LISBOA



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

EVOLUÇÃO DO CONTROLO REPRODUTIVO EQUINO EM PORTUGAL E AS SUAS
REPERCUSSÕES NA PRODUTIVIDADE

ANA BÁRBARA BATISTA DE ABEL TRAÇA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

ORIENTADOR

Doutor José Carlos Migueis Nunes Duarte

Presidente

Doutor Luís Lopes da Costa

CO-ORIENTADOR

Vogais

Doutor Rui Manuel V. Horta Caldeira

Doutor Rui Manuel Vasconcelos Horta Caldeira

Doutor Rui José Branquinho de Bessa

Doutor José Carlos Migueis Nunes Duarte

2010

LISBOA

AGRADECIMENTOS

Aos meus amigos e familiares, a eles que devo tudo o que sou e, principalmente à LusoPecus e toda a sua equipa, pelo modo como me receberam.

Ao Dr. José Carlos Duarte pela extrema disponibilidade em ajudar-me e pela sua maneira de ser e de encarar a vida, que me ensinou que nada é impossível. Ao Sr. Armando pelas longas conversas, provando que amizade não tem idade.

Ao Dr. Vasco Lopes e à sua colega An, pelos dias intermináveis e cheios de aprendizagem, e sem dúvida divertidos que passámos juntos. À Dr. Cristina Cosinha pela paciência, pelo que me ensinou e pela disponibilidade de conciliar os seus horários com os meus. À Dona Dulce, sempre bem-disposta, que me pôs sempre à vontade na LusoPecus. Ao Professor Miguel Saraiva Lima pela forma como me tem ajudado nestes

últimos anos do curso, e ao Professor Rui Caldeira pelo apoio dado na redacção da dissertação.

TÍTULO: Evolução do controlo reprodutivo equino em Portugal e suas repercussões na produtividade.

RESUMO: A produção de cavalos destinados ao segmento desportivo sofreu um grande aumento nas últimas décadas. Devido à importância do cavalo na prática de diversos desportos e em actividades de lazer, e não mais apenas no transporte ou tracção animal, é incontestável o crescimento mundial da indústria equina. A espécie equina foi considerada por muito tempo como a de menor fertilidade entre as espécies domésticas, o que foi atribuído a características de selecção e problemas relacionados com o manejo reprodutivo. Contudo, o desenvolvimento de novas técnicas reprodutivas veio possibilitar um maior desenvolvimento do sector através do ganho na eficiência reprodutiva e no melhoramento genético, favorecendo o aperfeiçoamento das raças e dos seus cruzamentos. Em resultado das incessantes pesquisas em biotecnologias aplicadas à reprodução equina, a Inseminação Artificial e a Transferência de Embriões têm-se destacado nas últimas décadas, em Portugal pelo seu avanço científico e aplicação comercial.

O objectivo desta dissertação é assim, o de avaliar o impacto que as novas práticas de manejo e a aplicação das novas tecnologias da reprodução assistida tiveram na evolução do controlo reprodutivo equino em Portugal e na produtividade destes animais, discutindo-se as vantagens e desvantagens do seu uso e descrevendo casos acompanhados no decorrer do Estágio.

A conclusão mais importante deste estudo é que garanhões e éguas bem geridas podem alcançar altos níveis de desempenhos reprodutivos e, logo, de produtividade, parâmetros decisivos no sucesso económico das explorações.

Palavras-chave: Reprodução Assistida, Equinos, Puro-Sangue Lusitano, Inseminação artificial, Transferência de Embriões, Tecnologias da Reprodução assistida.

TITLE: Evolution of equine reproductive control and their impact on productivity.

ABSTRACT: Horse's breeding for sports segment experienced a large increase in recent decades. Due to the importance of the horse in the practice of various sports and leisure activities, and not just as transport or animal traction, is undeniable the worldwide growth in the equine industry. The equine species was for long time considered to have the lowest fertility among the domestic species, which was attributed to selection and problems related to reproduction management. However, the development of new reproductive techniques is enabling a considerable development of the sector by increasing reproductive efficiency and breeding gains, favoring the improvement of breeds and their crosses. As a result of incessant research in equine reproductive biotechnology, Artificial Insemination (AI) and Embryos Transfer (ET) have emerged in the last decades in Portugal for its scientific and commercial advancement.

The objective of this dissertation is to assess the impact that new management practices and application of new assisted reproductive technologies had on the equine reproductive control evolution in Portugal and productivity of these animals. The advantages and disadvantages of its use and some cases followed during the internship are discussed.

The most important conclusion of this study is that stallions and mares well managed can achieve high levels of reproductive performance and therefore productivity, critical parameters in the economic success of farms.

Key Words: Assisted Reproduction, Equines, Lusitano's Thoroughbred, Artificial Insemination, Embryos Transfer, Assisted Reproductive Technology.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE TABELAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS	xii
1. ACTIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O ESTÁGIO	1
1.1. CASUÍSTICA DAS ACTIVIDADES DESENVOLVIDAS NO ESTAGIO ---	2
1.1.1. Profilaxia	2
1.1.2. Identificação de equinos	3
1.1.3. Controlo reprodutivo	3
1.1.4. Sistema músculo-esquelético	6
1.1.5. Patologia clínica	6
1.1.6. Outras actividades realizadas	7
1.2. CONCLUSÕES FINAIS	8
2. HISTÓRIA DO CAVALO E DA REPRODUÇÃO	9
2.1. O CAVALO	9
2.2. A REPRODUÇÃO	9
2.2.1. Inseminação Artificial	11
2.2.2. Transferência de Embriões	12
2.2.3. Outras técnicas de reprodução assistida	13
2.3. REPRODUÇÃO EM PORTUGAL	14
3. EVOLUÇÃO DO CONTROLO REPRODUTIVO EQUINO EM PORTUGAL E SUAS REPERCUSSÕES NA PRODUTIVIDADE	16
3.1. INTRODUÇÃO	16
3.2. A EVOLUÇÃO DO PSL COMO INCENTIVO DO DESENVOLVIMENTO DO CONTROLO REPRODUTIVO EQUINO EM PORTUGAL	18
3.3. REPRODUÇÃO EQUINA EM PORTUGAL	19
3.3.1. Década de 80: O Início	20
3.3.1.1. Palpação rectal	20
3.3.1.2. Monta natural	21
3.3.2. Década de 90: Primeiros Avanços	22
3.3.2.1. Ultrasonografia	22
3.3.2.2. Utilização de hormonas	26
3.3.2.3. Performance do Garanhão	26

3.3.3.	Século XXI: Reprodução Assistida-----	27
3.3.3.1.	Acompanhamento dos animais para a Reprodução -----	28
3.3.3.1.1.	Égua-----	29
3.3.3.1.2.	Garanhão -----	33
3.3.3.1.3.	Consequências do não acompanhamento reprodutivo -----	37
3.3.3.1.3.1.	Indistinação entre quistos uterinos/gestação inicial -----	37
3.3.3.1.3.2.	Impossibilidade de detecção de morte fetal -----	38
3.3.3.1.3.3.	Impossibilidade de detecção de anormalidades fetais-----	38
3.3.3.1.3.4.	Impossibilidade de detecção de patologias uterinas e vaginais-----	39
3.3.3.1.3.5.	Transmissão doenças venéreas bacterianas -----	40
3.3.3.1.3.6.	Transmissão de doenças virais-----	41
3.3.3.1.3.7.	Impossibilidade de detecção de tumores -----	42
3.3.3.2.	Sincronização hormonal do estro -----	42
3.3.3.2.1.	Luteólise-----	43
3.3.3.2.2.	Prolongamento da fase lútea-----	44
3.3.3.2.3.	Indução da ovulação -----	45
3.3.3.3.	Recolha e avaliação de sémen -----	46
3.3.4.	Actualidade: Tecnologias da Reprodução Assistida -----	49
3.3.4.1.	Técnicas de Reprodução Assistida já em uso em Portugal-----	51
3.3.4.1.1.	INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL -----	51
3.3.4.1.1.1.	Inseminação Artificial com sémen fresco -----	55
3.3.4.1.1.2.	Inseminação Artificial com sémen refrigerado -----	55
3.3.4.1.1.3.	Inseminação Artificial com sémen congelado-----	56
3.3.4.1.1.4.	Inseminação Artificial com doses baixas de sémen -----	59
3.3.4.1.2.	TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES -----	61
3.3.4.1.2.1.	Transferência de Embriões por contraste de raça -----	67
3.3.4.2.	Futuro: Novas Técnicas de Reprodução Assistida -----	68
3.3.4.2.1.	Técnicas com interesse e aplicabilidade clínica recente em Portugal --	69
3.3.4.2.1.1.	Refrigeração, Criopreservação e Transporte de Embriões-----	69
3.3.4.2.1.2.	Superovulação -----	72
3.3.4.2.2.	Técnicas com pouca aplicabilidade na prática clínica em Portugal-----	73
3.3.4.2.2.1.	Fertilização <i>in vitro</i> -----	74
3.3.4.2.2.2.	Fertilização <i>in vivo</i> -----	74
3.3.4.2.2.3.	Fertilização Assistida – Injecção intracitoplasmática de sémen (ICSI) -----	76
3.3.4.2.2.4.	Transferência Nuclear (NT) ou Clonagem -----	77
3.3.4.2.2.5.	Sexagem de sémen ou embriões. -----	77
3.4.	Repercussões na Produtividade -----	79
3.4.1.	Repercussões na diminuição do número de cobrições ou inseminações -----	80
3.4.2.	Repercussões na diminuição do intervalo entre partos -----	81

3.4.3.	Repercussões no aumento do número de poldros produzidos---	82
3.4.4.	Repercussões do melhoramento genético-----	83
3.5.	Casos Clínicos-----	86
3.5.1.	Égua 1 -----	86
3.5.2.	Égua 2 -----	88
3.5.3.	Égua 3 -----	90
3.6.	Discussão dos casos clínicos-----	98
4.	Conclusão -----	101
	Bibliografia -----	103

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Centro de recolha e congelação de sémen de garanhões, número PT3E01CS, da LusoPecus.-----	1
Figura 2 – Vacinação e desparasitação de éguas. -----	2
Figura 3 – Diferentes áreas do controlo reprodutivo equino exercidas no Estágio. -----	4
Figura 4 – Diferentes áreas do controlo reprodutivo equino exercidas no Estágio (2). -	5
Figura 5 – Diferentes actividades realizadas na patologia músculo-esquelética. -----	6
Figura 6 – Diferentes áreas da patologia clínica equina exercidas no Estágio. -----	7
Figura 7 – Poldro com atresia anal. -----	8
Figura 8 – Transferência de Embriões por contraste de raça em vacas. -----	15
Figura 9 – Imagens representativas das dificuldades da década de 80. -----	22
Figura 10 – Controlo ecográfico da égua em cio. -----	24
Figura 11 – Controlo ecográfico precoce da gestação.-----	25
Figura 12 – Diferenciação entre um quisto uterino e uma gestação inicial.-----	38
Figura 13 – Gestações gemelares.-----	39
Figura 14 – Patologias uterinas e vaginais. -----	39
Figura 15 – Tumores-----	42
Figura 16 – TE por contraste de raça em equinos. -----	68

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Historial clínico da égua 1 no centro.-----	88
Tabela 2 – Historial clínico da égua 2 no centro.-----	90
Tabela 3 – Historial clínico da égua 3 no centro.-----	95

LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS

APSL – Associação Portuguesa de criadores do cavalo Puro-sangue Lusitano

ART – Assisted Reproduction Technologies

CEM – Contagious equine metritis (Metrite Contagiosa Equina)

Dr. – Doutor

eCG – Gonadotrofina do soro de égua gestante

EIA – Equine Infectious Anemia (Anemia Infecciosa Equina)

EPE – Extracto Pituitário Equino

erLH – LH recombinante equina

et al. – *et alii* (e outros)

etc. – *et cetera* (e o resto)

EVA – Equine Viral Arteritis (Arterite Viral Equina)

FSH – Hormona Folículo Estimulante

GIFT – Gamete Intrafallopian Transfer (Transferência Intrafalópio de Gâmetas)

GnRH – Hormona Libertadora de Gonadotrofinas

hCG – Gonadotrofina Coriônica Humana

IA – Inseminação Artificial

ICSI – Intracytoplasmatic Sperm Injection (Injecção Intracitoplasmática de sémen)

NT – Nuclear Transfer (Transferência Nuclear)

OT – Oocyte Transfer (Transferência de Oócitos)

PSL – Puro-sangue Lusitano

PGF2 α – Prostaglandina F2 α

spz - espermatozóide

TE – Transferência de Embriões

1. ACTIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O ESTÁGIO

Esta dissertação tem como base prática o acompanhamento e participação em actividades durante os quatro meses de estágio curricular do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, entre Janeiro de 2010 e Maio de 2010, o qual decorreu na LusoPecus, empresa de prestação de serviços veterinários, sediada no Porto Alto e da qual o meu Orientador de estágio, Dr. José Carlos Duarte é um dos proprietários, juntamente com o Dr. Luís Fragoso. Há 19 anos que presta serviços em várias áreas da Medicina Veterinária e Produção Animal abrangendo as várias espécies animais incluindo duas clínicas de pequenos animais, sediadas no Porto Alto e Samora Correia e um centro de Recolha e Congelação de sêmen equino desenvolvendo igualmente uma componente clínica, estando equipado com material essencial ao tratamento das mais diversas patologias e ao diagnóstico, principalmente, de patologias ortopédicas e do aparelho reprodutivo. Para além do trabalho diário do Dr. Duarte, acompanhei e ajudei também o Dr. Vasco Amaro Lopes e a Dra. Cristina Cosinha.

O Estágio teve como objectivo acompanhar e participar no dia-a-dia no centro de recolha e congelação de sêmen de garanhões, número PT3E01CS, que a LusoPecus desenvolveu. As actividades veterinárias realizadas abarcaram desde o controlo reprodutivo, passando pela profilaxia e identificação equina, patologias músculo-esqueléticas e outras da área clínica. O Estágio inclui também o acompanhamento daqueles Médicos Veterinários na sua actividade de clínica ambulatória, permitindo assim contactar com outras vertentes da Medicina Veterinária, como a Cirurgia e Clínica de Espécies Pecuárias mas também clínica e radiologia de pequenos animais.



Figura 1 – Centro de recolha e congelação de sêmen de garanhões, número PT3E01CS, da LusoPecus.

A maior parte dos serviços prestados foram realizados na região do Ribatejo. Com menor frequência, abrangeu ainda a zona de Mafra, Leiria, Abrantes, Tomar, Golegã e Baixo Alentejo.

1.1.CASUÍSTICA DAS ACTIVIDADES DESENVOLVIDAS NO ESTAGIO

Muitas foram as actividades desenvolvidas durante estes meses de trabalho e inúmeras foram as competências adquiridas. A área de foco do meu estágio foi a Reprodução, mas muitas outras foram abordadas, durante a realização do estágio fora da época reprodutiva equina (que neste ano começou mais tarde do que nos anos anteriores). Durante o estágio, foi-me permitido discutir a etiologia, os diagnósticos diferenciais, a terapêutica a instituir e os prognósticos dos diversos casos encontrados. Participar através da administração de fármacos por diversas vias (oral, endovenosa e intramuscular), do tratamento de feridas e mudanças de pensos, da utilização de material de diagnóstico e outras. Farei de seguida uma descrição geral das actividades realizadas.

1.1.1. Profilaxia

A área da profilaxia teve maior ênfase no primeiro mês de estágio (Fevereiro). Participei na vacinação e desparasitação de várias espécies animais (equinos, bovinos, caprinos, canídeos e felinos), tendo tido oportunidade de aplicar os conhecimentos adquiridos relativamente aos fármacos usados, bem como o local, via e tempos de administração.

A vacinação e desparasitação de Equinos foi realizada principalmente em grandes coudelarias (5), com uma média de 35 animais cada, mais escassas foram as situações de pequenos criadores. As vacinas foram administradas via intramuscular na tábua do pescoço e as desparasitações mais frequentes foram administradas por via endovenosa seguida da administração por via oral.



Figura 2 – Vacinação e desparasitação de éguas.

1.1.2. Identificação de equinos

Na identificação de equinos adquiri conhecimentos práticos na realização de resenhos, colocação de *microchips* e recolha de amostras de sangue.

O resenho é um método de identificação, com o objectivo de solicitar a emissão do certificado de origem ou “Livro Azul” e para possibilitar a inscrição do animal no livro genealógico da raça, bem como acompanhar o animal nas suas deslocações.

As colheitas de sangue também fazem parte do protocolo de identificação dos equinos de raça Lusitana, pois são um procedimento obrigatório da Associação de Criadores do Cavalo Puro-sangue Lusitano (APSL) para a inscrição no livro genealógico e para o controlo de paternidade.

Os *microchips* são outro método de identificação electrónico, embora não obrigatório. Estes procedimentos foram aplicados a todos os animais identificados, em grandes coudelarias, os quais representaram cerca de 100 poldros.

Particpei ainda em Exames de Acto de Compra (6/7), nos quais aprendi como se fazem, em que consistem, como aconselhar os interessados e que erros não cometer de modo a não pôr em risco o interesse dos que participam na aquisição do animal.

1.1.3. Controlo reprodutivo

Foi no domínio da Reprodução que se registou um maior número de intervenções. Tal facto pode ser facilmente explicado pelo rigoroso controlo ginecológico que é necessário existir quando se entra na época da reprodução. Esta área teve maior ênfase a partir de meados de Março até à presente data de início da redacção da dissertação (fim de Maio). Salienta-se:

- Exame ginecológico da égua, que engloba observação da genitália, palpações rectais, exploração ecográfica, etc;
- Identificação e tratamento de afecções do aparelho reprodutor da égua e do garanhão, com principal foco nas doenças infecciosas. Muitos foram os exames de controlo da presença de agentes de certas doenças para aprovação do internamento dos animais no centro, como a *Taylorella equigenitalis* (Metrite contagiosa equina) e *Salmonella* no caso das éguas. Nos garanhões onde se pretende realizar a colheita de sémen, são feitos exames bacteriológicos, para despiste, principalmente, da Metrite Contagiosa, e virulógicos para despiste da Artrite Viral Equina e da Anemia Infecciosa. Muitas bactérias comensais, incluindo a

Escherichia coli, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas spp* e *Klebsiella spp* encontram-se na parte exterior do pénis do garanhão e não são consideradas patogénicas, mas em alguns casos foi feito o despiste por isolamento no ejaculado;

- Colheita de sémen a garanhões com recurso a uma vagina artificial sobre uma égua residente ou manequim ou em estação. A recolha de sémen fez-se ao longo de todo o Estágio sistematicamente, em média de 2/3 por dia. A recolha mais habitual foi realizada com recurso ao manequim, muito poucas vezes sobre a égua residente e apenas 4 vezes com o garanhão em estação;
- Processamento do sémen para congelação ou refrigeração, ou utilização em fresco, consoante o caso específico. A maioria das vezes fez-se inseminação das éguas com sémen fresco também houve um uso considerável de sémen refrigerado e um número reduzido de sémen congelado;
- Utilização do ecógrafo e interpretação das ecografias transrectais na égua. Foi dos procedimentos mais efectuados ao longo do estágio com uma média de 15 éguas por dia durante 2 meses, incluindo fins-de-semana. A maioria das ecografias foi realizada para avaliar o desenvolvimento folicular, outras para diagnósticos de gestação a partir dos 11 dias e mais raramente para diagnósticos de gestação avançada (3 meses nalgumas e noutras 6 meses). Em menor escala, o exame ecográfico foi usado para diagnóstico de patologias reprodutivas.
- Tratamentos hormonais e lavagens uterinas. Foram realizadas lavagens uterinas com Lactato Ringer (LR) e administração intra-uterina de antibióticos. Foi possível diagnosticar quistos uterinos e quistos foliculares em algumas éguas. De salientar, que houve necessidade de se proceder a tratamento hormonal de garanhões como forma de aumentar o libido. A administração PGF2a (Dinoprost Tromethamine) e hCG (Gonadotrofina Coriónica Humana) foram dos tratamentos hormonais mais realizados para a indução do cio e o indução da ovulação respectivamente;



Figura 3 – Diferentes áreas do controlo reprodutivo equino exercidas no Estágio.

Legenda: A – controlo reprodutivo por ecografia transrectal; B – recolha de sémen com auxílio a um manequim; C – monta natural controlada a uma égua após avaliação ecográfica; D – lavagem intra-uterina.

- Acompanhamento do processo de inseminação artificial na égua. A grande maioria das vezes o controlo do cio teve como objectivo o de inseminar a égua artificialmente, mais raros foram os casos para monta natural.
- Acompanhamento do processo de transferência de embriões, desde o controlo do cio da dadora e receptora, flushing e transferência para a receptora. Embora se tenha tentado fazer a sincronização de cios de vários grupos de éguas apenas num dos casos foi possível fazer a transferência de embriões;
- Cuidados neonatais com os poldros recém-nascidos e/ou prematuros;
- Estabelecimento da imunidade passiva materna após detecção de falha de transferência;
- Administração de leite de substituição ou de colostro ordenhado da égua administrando-o, de seguida, ao poldro por entubação nasogástrica;
- Resolução de partos distócicos. Acompanhei 6 partos assistidos, dois dos quais sobreviveram ao parto, tendo falecido ambos, alguns dias após o parto e os restantes morrerem durante o parto. Apenas num dos casos a égua morreu durante o parto.

Nesta área tive oportunidade de participar activamente em todas as actividades, onde o exame ginecológico teve maior importância em comparação com as outras actividades de controlo reprodutivo.



Figura 4 – Diferentes áreas do controlo reprodutivo equino exercidas no Estágio (2).

Legenda: A – inseminação artificial com sêmen fresco; B – recolha de embrião; C – parto distócico; D – cuidados neonatais com um poldro recém-nascido.

1.1.4. Sistema músculo-esquelético

Esta área, também referida como Ortopédica, apresentou uma elevada frequência de solicitação, praticamente diária e em algumas situações mais de 3 casos por dia, ao longo de todo o Estágio. Acompanhei e participei nas seguintes actividades:

- Realização de exame clínico de claudicação: como iniciá-lo e quais as etapas subsequentes;
- Utilização de meios auxiliares de diagnóstico, como testes de flexão, pinça de cascos, raio-X, ecografia e interpretação dos resultados;
- Detecção do local e do tipo de lesão através de bloqueios anestésicos dos nervos regionais; modalidades terapêuticas adequadas a cada patologia diagnosticada, como foram exemplo infiltrações intra-articulares, administração medicamentosa, e colocação de pensos; a extrema importância da assépsia das regiões a tratar;
- Casos de traumatologia e cirurgia.



Figura 5 – Diferentes actividades realizadas na patologia músculo-esquelética.

Legenda: A – uso da pinça de cascos; B – testes de flexão; C – assepsia da região a tratar; D – infiltração intra-articular.

1.1.5. Patologia clínica

Esta foi uma área com pouco relevo mas tive a oportunidade de colaborar nos seguintes campos:

- Neonatologia: diarreias, desidratação, alergias, defeitos de conformação dos membros, traumatologias;
- Aparelho digestivo: tratamento e diagnóstico de cólicas, intoxicações alimentares, diarreias, um caso de ílio paralítico e correcção de pontas dentárias;
- Dermatologia: tratamento de feridas e lacerações mas também algumas dermatofitíases;

- Reprodução: 3 orquiectomias, 1 ovariectomia, 1 caso de prolapso do clítoris, 1 cesariana;
- Aparelho respiratório: tratamento de pneumonias ligeiras e casos de tosse;
- Outros: afecções oftálmicas, um caso de babesiose e diagnóstico e tratamento de animais atáxicos e diagnóstico de melanomas.

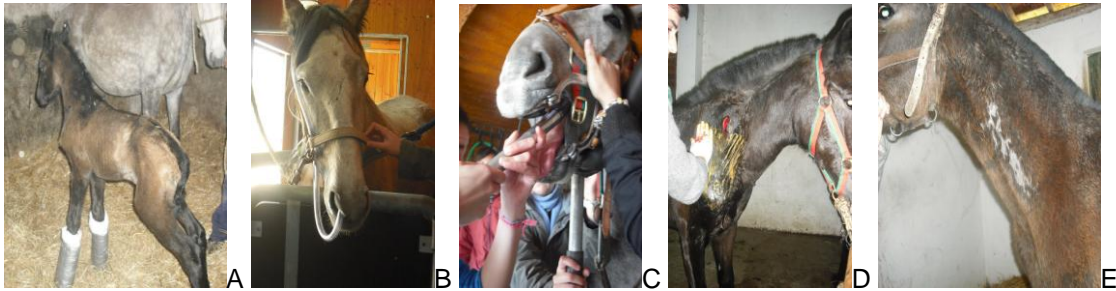


Figura 6 – Diferentes áreas da patologia clínica equina exercidas no Estágio.

Legenda: A – aplicação de talas num poldro com defeitos na conformação dos membros; B – entubação naso-gástrica; C – correcção de pontas dentárias; D – tratamento de feridas; E – um caso de problemas dermatológicos.

1.1.6. Outras actividades realizadas

Tive ainda oportunidade de participar nas seguintes actividades:

- Colocação de brincos, desparasitações, vacinações e tuberculinizações em bovinos;
- Palpação rectal, indução do cio, diagnósticos de gestação, tratamentos hormonais em bovinos;
- Cesariana a uma cabra anã, com um nado morto;
- Raio-X a canídeos, com fracturas;
- Cirurgia e pós-operatório de um poldro com atresia anal;

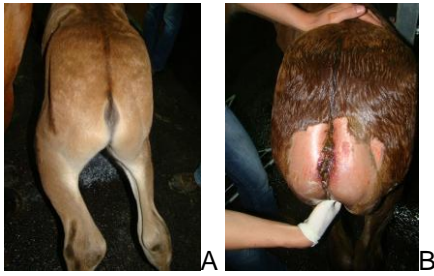


Figura 7 – Poldro com atresia anal.

Legenda: A – Poldro antes da cirurgia (ânus fechado); B – poldro após a cirurgia.

1.2. CONCLUSÕES FINAIS

Como se pode constatar durante os meses de Estágio foi-me dada a oportunidade de assistir e participar em inúmeros casos. Devido ao grande número de garanhões e éguas que são acompanhadas diariamente e às boas infra-estruturas e equipamentos disponíveis, foi possível atingir o objectivo deste Estágio, nomeadamente no que respeita ao aprofundar dos conhecimentos ao nível da clínica reprodutiva equina, que tem vindo a crescer nos últimos anos.

A realização deste Estágio foi de grande importância na minha evolução profissional pondo-me a par da realidade prática no nosso país, complementando a formação adquirida ao longo dos passados cinco anos na Faculdade.

A possibilidade de acompanhar o trabalho de veterinários com grande experiência nesta área foi muito enriquecedora, tanto pela contínua aprendizagem prática e teórica como pela experiência de um veterinário com longa prática na reprodução equina, Dr. José Carlos Duarte.

2. HISTÓRIA DO CAVALO E DA REPRODUÇÃO

2.1. O CAVALO

A história da criação de cavalos remonta a milénios. Embora a data exacta ainda não seja conhecida, o Homem poderá ter domesticado o cavalo há cerca de 5000 d.C, apontando-se para os Botai do Médio Oriente como os primeiros criadores de cavalos. Não se sabe ao certo, mas pensa-se que os cavalos percorriam as paisagens da Europa há dezenas de milhares de anos atrás, durante a idade do gelo. Provas pré-históricas encontradas na Europa Ocidental, como restos de cavalos e antigas armas de caça mostram que muito antes dos cavalos serem montados pelos humanos, eram usados como bestas de carga, tal facto é evidenciado por antigas imagens esculpidas em osso ou pinturas profundas dentro das cavernas, sugerindo que os cavalos desempenhavam um papel importante nos rituais dos povos pré-históricos (American Museum of Natural History – AMNH).

As diferentes raças de cavalos variaram, com a cultura e com o tempo. O uso dado a cada cavalo determinou as suas qualidades, onde os “*amblers*” (cavalos que andam a um compasso mais lento) eram adequados para a equitação, os cavalos rápidos para o transporte de mensageiros, os cavalos pesados para arar e puxar carroças pesadas, os póneis para puxar carros de minas de minério, etc. Na época medieval os cavalos eram usados principalmente para as batalhas, mas no início da renascença começaram a ser incorporados na alta escola de equitação da nobreza.

A necessidade do uso de cavalos para trabalho e transporte pesado prolongou-se até à revolução industrial e até ao desenvolvimento do automóvel e do tractor. Desde então o uso do cavalo caiu significativamente, permanecendo principalmente nas actividades recreativas e de desporto.

2.2. A REPRODUÇÃO

O melhoramento genético de qualquer espécie é conseguido através da selecção de machos e fêmeas com alta capacidade de gerar descendentes de alto mérito genético. Durante muitos anos foram aplicadas pressões selectivas nas espécies, mas os maiores progressos genéticos e a aquisição da maioria do conhecimento referente à reprodução foram realizados nos últimos 60/70 anos. Muito desse progresso foi obtido através do conhecimento e da investigação científica, mas maioritariamente proveio do

aproveitamento de processos reprodutivos desenvolvidos e utilizados em outras espécies animais (Bearden & Fuquay, 1998).

“A reprodução serve pelo menos três propósitos (Bearden & Fuquay, 1998, p.2):

- a) Perpetuação da espécie. O maior desejo de um indivíduo de qualquer espécie, incluindo o Homem é manter-se a si próprio; o maior impulso num indivíduo é salvar a sua própria vida. A reprodução é o segundo maior impulso da Natureza para a manutenção das espécies.
- b) Fornecimento de alimento. O Homem aprendeu a controlar ambas as espécies domésticas e selvagens para que os animais excedentes pudessem ser colhidos para o fornecimento de carne. Através da selecção, ele desenvolveu a capacidade de produção de leite de algumas espécies, de modo que o leite também se tornou um elo importante na cadeia alimentar humana.
- c) Melhoramento genético. A gestão e alteração dos processos reprodutivos naturais têm sido utilizadas como ferramentas genéticas.”

Conta a História que Aristóteles escreveu o primeiro artigo científico sobre embriologia (384-322 a.C.), tendo descrito o embrião humano como sendo gerado de sangue menstrual da mãe. Em 1672, Graaf descreveu o folículo ovárico, enquanto que Hamm e Leewenhoek, no início da era do microscópio (1677) observou e descreveu o espermatozóide humano. Em 1864, Pasteur demonstrou que as bactérias se reproduzem por elas próprias por divisão celular, destruindo a teoria da geração espontânea. Driesch, em 1900, forneceu a prova final que a vida provinha de células únicas, separando células filhas de um ovo fertilizado e mostrando que estas resultariam num embrião.

A maior quantidade de conhecimento referente à reprodução foi adquirido a partir de 1900, mas a investigação sobre este tema ainda permanece bastante dinâmica. A aplicação das novas técnicas e a consequente maior eficiência reprodutiva tem sido bastante reforçada, desde a origem humilde da reprodução assistida em laboratório, à aplicação das tecnologias reprodutivas no campo das diversas espécies animais.

Nos últimos anos, as técnicas de reprodução assistida assumiram muitas formas, desde a simples assistência a uma cópula natural sob um ambiente controlado até à clonagem de animais adultos (Long, Walker, Tang & Westhusin, 2003) em diversas espécies animais. O desenvolvimento das tecnologias de reprodução assistida (assisted reproduction technologies - ART) no cavalo remonta ao século XIX com o estabelecimento de gestações em equinos obtidas por meio de inseminação artificial

(Landim-Alvarenga et al., 2008) e transferência de embriões e cada vez mais por inúmeras outras tecnologias.

2.2.1. Inseminação Artificial

Segundo a lenda, a Inseminação Artificial (IA) foi utilizada pela primeira vez no ano de 1332, em equinos, pelos árabes. Mas a história regista como marco inicial da IA, o ano de 1780, quando um fisiologista italiano, L. Spallanzani, demonstrou pela primeira vez, em cães, ser possível a fecundação de uma fêmea sem o contacto com o macho, e mais tarde, quando demonstrou conseguir filtrar o componente fértil do sémen separando-o do líquido seminal. Em 1803, o mesmo autor congelou sémen usando neve e verificou que os espermatozóides recuperavam a motilidade depois de aquecidos, embora esta estivesse diminuída (Bearden & Fuquay, 1998). As novas descobertas estimularam o estudo das células sexuais e o processo de fertilização, embora tenha demorado muito tempo até estas descobertas terem sido reportadas.

Em 1900 começaram estudos com animais de espécies pecuárias. Ivanoff começou a trabalhar com cavalos mas as primeiras inseminações artificiais com sucesso ocorreram em cabras e ovelhas. O mesmo autor, em 1912 inseminou 39 éguas e obteve uma taxa de gestação de 79% (Faria, 1991a). A partir daqui um elevado número de grandes descobertas, ajudaram no elevado nível de sucesso da IA, como a invenção da vagina artificial para recolher sémen a um cão, por um professor da universidade de Roma G. Amantea, em 1914. Mais tarde a vagina artificial foi adaptada às grandes espécies (Bearden & Fuquay, 1998).

A IA foi reconhecida por muitos cientistas e criadores como um dos maiores progressos genético até 1930. A primeira associação de IA foi formada na Dinamarca em 1936 (Bearden & Fuquay, 1998). Em 1957 o serviço de reprodução americano foi pioneiro no uso de azoto como fluido para congelar e armazenar o sémen em grandes contentores próprios. No mesmo ano é conseguido em Guelph-Ontário, Canadá, a primeira gestação proveniente de sémen equino congelado (Bearden & Fuquay, 1998; Betteridge, 2003). O sucesso da congelação de sémen tornou-se uma realidade a partir de 1975. Em 1979, Martin desenvolveu um método de congelação de sémen, que integrava várias etapas, desde a colheita, ao exame macro/microscópico passando pela diluição, centrifugação, congelação, descongelação, etc (Bearden & Fuquay, 1998; Betteridge, 2003).

A partir de 1980, os resultados da IA ganharam expressão comparativamente à década anterior (Bearden & Fuquay, 1998). O uso da IA contribuiu em grande escala, tanto no controlo de doenças transmitidas pela reprodução como no melhoramento

genético. Nos últimos anos houve um grande aumento na utilização da IA em equinos, com mais de 90% das éguas inseminadas com sémen refrigerado, em certas regiões da Europa. A IA com sémen congelado é menos utilizada, contribuindo no entanto para um número significativo de inseminações em vários países (Rocha, 2010).

2.2.2. Transferência de Embriões

A história da primeira Transferência de Embriões (TE) bem sucedida data em 1891, há mais de um século, e foi efectuada em coelhos por Heape (Betteridge, 2003; Blanchard et al., 2003; Jainudeen, Wahid & Hafez, 2004). A comercialização desta tecnologia iniciou-se na América do Norte na década de 1970 (Jainudeen et al., 2004) e foi desenvolvida primeiramente noutras espécies animais. Whittingham, em 1972 e Wilmut e Rowson, em 1973, alcançaram o nascimento de uma ninhada de camundongos e de um bezerro, respectivamente, produzidos com embriões congelados (Betteridge, 2003).

Em cavalos, foi descrito pela primeira vez por Oguri & Tsutsumi, em 1974, o nascimento de um poldro de pônei resultado de uma TE (Betteridge, 2003; Jainudeen et al., 2004). Nessa altura, os embriões eram recolhidos de ovidutos ou úteros de dadoras após o abate ou cirurgia (Jainudeen et al., 2004). Desde 1976 e 1990, respectivamente, a recuperação transcervical de embriões e por laparotomia são praticadas rotineiramente. A refrigeração e o transporte de embriões foram descritos pela primeira vez em 1987 (Betteridge, 2003).

Apesar de ser uma técnica que permite que uma mesma égua produza mais de um poldro por ano, havia a limitação de apenas ser permitida uma TE por ano, na espécie equina, uma vez que só era possível o registo de um poldro por égua por ano, imposta pela maior parte dos livros genealógicos da raça. Nos Estados Unidos da América, em 2002, a Associação do *American Quarter Horse*, retirou a regra governamental da restrição do número de embriões transferidos por égua por ano e permitiu, retrospectivamente, o registo de múltiplos poldros derivados de TE desde que tinha sido introduzida a TE na legislação da associação (McKinnon & Squires 2007).

2.2.3. Outras técnicas de reprodução assistida

O primeiro poldro nascido oriundo de Transferência de Oócitos ocorreu no final da década de 80 (McKinnon *et al.*, 1988). Desde então, inúmeras pesquisas têm sido realizadas, promovendo a evolução da técnica.

Os primeiros descendentes como resultado de fertilização *in vitro* foram coelhos, reportados em 1959 (Bearden & Fuquay, 1998). A meio dos anos 80, foram inaugurados inúmeros laboratórios que comercializavam fertilização *in vitro* nos EUA, Canada, Europa e, mais tarde, Brasil e Argentina. O nascimento do primeiro poldro pela técnica de fertilização *in vitro* foi relatado em 1991 (Jainudeen *et al.*, 2004). O primeiro poldro nascido de Injeção Intracitoplasmática de sémen (Intra Cytoplasmic Sperm Injection – ICSI) ocorreu no Colorado em 1996 (Squires, 2005), realizada por Squires utilizando um oócito maturado *in vitro*. Galli *et al.*, (2002), obtiveram gestações e nascimentos após o cultivo *in vitro* de embriões produzidos através de ICSI, os quais foram congelados e transferidos para o útero de receptoras.

A primeira Transferência Intrafalópica de Gâmetas (Gamete Intrafallopian Transfer - GIFT) foi reportada em 1998. Em 2001 nasceram os primeiros poldros após congelamento de oócitos equinos (Samper *et al.*, 2007).

Desde meados de 1980, outras tecnologias foram desenvolvidas para transferir o núcleo de blastómeros ou de células somáticas para um óvulo sem núcleo (Transferência Nuclear ou Clonagem). Até à data, a transferência nuclear de células somáticas foi usada para clonar bovinos, ovinos, suínos, caprinos, cavalos, mulas, gatos, coelhos, ratos e camundongos (Allen, 2005; Nacional Institute of Food and Agriculture – NIFA). Os primeiros bovinos produzidos por Transferência Nuclear (Nuclear Transfer – NT) foram descritos em publicações em 1987, por Prather. Uma década de trabalho depois (1997) foi reportada por Wilmut *et al.*, a primeira ovelha clonada por transferência nuclear de células somáticas adultas, demonstrando que era possível clonar mamíferos adultos. Em 2003, nasceram 3 mulas e um poldro clonados (Hinrichs & Young-Ho Choi, 2005). Até ao momento, várias companhias comerciais começaram a trabalhar em transferências nucleares, mas esta tecnologia ainda apresenta baixa eficiência.

2.3. REPRODUÇÃO EM PORTUGAL

Portugal tem acompanhado a evolução em termos de reprodução equina, embora não atinja o mesmo grau de progresso dos países mais desenvolvidos nesta área, como os EUA, Reino Unido, Alemanha, Holanda, Bélgica, França ou Suíça. Isto deve-se sobretudo à dimensão do mercado nacional, que leva a que as receitas da produção animal não permitam um investimento equiparável ao dos outros países, limitando o desenvolvimento e/ou aplicação das técnicas até agora desenvolvidas. As primeiras ARTs mais utilizadas em Portugal, como a IA e a TE, foram realizadas em animais de produção (bovinos, caprinos, ovinos, suínos), pelo enorme interesse que estes têm na indústria animal (Duarte, 2010, comunicação pessoal).

Em 1942, a Estação de Fomento Pecuário de Lisboa, foi a primeira instituição a fornecer os serviços de Inseminação Artificial (Robalo, 1990a), em Bovinos.

“A evolução da Inseminação Artificial em Portugal considera os seguintes períodos ou fases (Robalo Silva, 1990a, p.53):

- a) 1942 – 1952: aplicação de sémen fresco produzido no centro de IA da Estação de Fomento Pecuário de Lisboa, aplicação feita exclusivamente por Médicos Veterinários.
- b) 1952 – 1964: extensão dos serviços de IA com sémen fresco às áreas de Coimbra, Santarém, Viseu, Évora, Porto e Braga; em 1956 foram criados os serviços de IA da Estação de Fomento Pecuário de Aveiro.
- c) 1966: início da aplicação de sémen congelado a -196°C ; a possibilidade do transporte do sémen congelado levou à rápida divulgação da IA.
- d) 1975: estruturação da rede de inseminação artificial nos moldes actuais considerando Centros de produção de sémen (Centros de IA) e unidades de aplicação de sémen (Subcentros de IA).
- e) 1982: privatização da inseminação artificial, isto é, transferência progressiva da responsabilidade dos Subcentros de IA para as organizações de criadores ou para as próprias explorações, sendo o controlo directo feito pelas Direcções Regionais de Agricultura.”

A TE só começou a ter expressão em Portugal a partir de 1987 em bovinos (Robalo Silva, 1993b), actividade iniciada pela Estação Nacional de Selecção e Reprodução Animal, sedeadada na Venda Nova (ENSRA), embora, Duarte (2010), em comunicação pessoal faça referência a uma equipa veterinária constituída por Duarte, França e Paisana, que em 1983 começou a usar esta técnica regularmente em bovinos. Em 1989, foi feita a primeira importação de embriões congelados de vacas seleccionadas nos EUA para produção de reprodutores para os centros de IA. Duarte, França e Paisana em 1985/6 foram pioneiros em Portugal na TE por contraste de raça, usando como dadoras raças zootecnicamente superiores (Holstein-Frísia) e como receptoras outras raças de menor valor (Charolês) (Duarte, 2010, comunicação pessoal).



Figura 8 – Transferência de Embriões por contraste de raça em vacas.

Legenda: A – primeiro bezerro nascido por contraste de raça; B – Grupo de vacas Charolês com vitelos de raça Holstein-Frísia (Imagens gentilmente cedidas por Duarte).

Embora estas tecnologias estejam disponíveis para inúmeras outras espécies, como o cavalo, a venda desses serviços têm sido mais limitada do que para a espécie bovina, por questões de mercado e procura.

3. EVOLUÇÃO DO CONTROLO REPRODUTIVO EQUINO EM PORTUGAL E SUAS REPERCUSSÕES NA PRODUTIVIDADE

3.1. INTRODUÇÃO

A actual conjuntura da criação de cavalos tem surpreendido com a grande amplitude e diversificação das actividades que esta espécie tem permitido criar, desenvolvendo assim a indústria equina que hoje possui um importante papel sócio-económico. Nos últimos anos, o desenvolvimento da equinicultura teve um avanço significativo, destacando-se um sensível aumento no número de equinos e no número de praticantes de equitação de desporto, lazer e equinoterapia. O número de cavalos em relação à população do país é de 2,5 por 1000 habitantes em Portugal (Aurich & Aurich, 2006).

Entre os grandes animais, os cavalos são aqueles com quem o Homem tem uma relação privilegiada. Os equinos apresentam na nova sociedade contemporânea uma forte ligação ao bem-estar, ao lazer e às actividades lúdicas próximas da Natureza. Portugal está a atravessar um momento de grande interesse pelo cavalo, tanto pela aptidão do cavalo Lusitano para as práticas lúdicas e desportivas, como pela importância que este animal teve na história do nosso país e em todas as tradições que lhe estão associadas.

O cavalo de Puro-sangue Lusitano (PSL) apresenta-se como a mais importante raça equina autóctone portuguesa. A partir da base de dados do Registo Nacional de Equinos da Fundação Alter Real compilou-se um ficheiro de genealogias com 50603 indivíduos, nascidos entre 1824 e 2007. Até 2007, o número de animais inscritos no Livro de Adultos (Reprodutores) da raça, era de 15 496 (4195 machos e 11301 fêmeas) (Vicente, Carolino, & Gama, 2009). Para além dos cavalos de raça registados, há um número maior ainda de animais cruzados sem registo servindo aos mais diferentes propósitos.

Hoje o efectivo da Raça Lusitana está em crescimento, sobretudo na Europa e no Brasil, onde há uma extraordinária progressão em quantidade e qualidade. Entre nós, a qualidade geral da produção tem aumentado muito, e tudo leva a crer que se venham a estabelecer novas linhas dentro da Raça, contribuindo para o seu progresso e assegurando a sua vitalidade (Associação Portuguesa de Criadores do Cavalo Puro Sangue Lusitano - APSL).

Tudo isto induziu ao aperfeiçoamento de técnicas na área reprodutiva por parte dos médicos veterinários, possibilitando o aparecimento de novas linhas de pesquisa, principalmente no cavalo Lusitano, fomentando-se cada vez mais como ferramenta para acelerar o ganho genético e tornar os nossos animais mais competitivos. Em Portugal, nos últimos anos, tem-se vindo a aperfeiçoar técnicas como a IA de éguas com sémen fresco, refrigerado e congelado, a refrigeração e congelação de sémen de garanhões e, mais recentemente, a TE.

Estas técnicas têm-se focado em obter melhores taxas de concepção em indivíduos mais idosos, com sinais de infertilidade, além de maximizar o aproveitamento de animais férteis de alto potencial genético.

Entretanto, o crescimento acelerado do efectivo equino necessita a cada dia de mais esforços e estudos científicos para viabilizar a sua manutenção e aprimorar o trabalho de selecção genética, bem como atender às expectativas do mercado nacional e internacional.

3.2.A EVOLUÇÃO DO PSL COMO INCENTIVO DO DESENVOLVIMENTO DO CONTROLO REPRODUTIVO EQUINO EM PORTUGAL

Antigamente os cavalos que existiam em Portugal não tinham qualquer especificidade. Embora nascidos no nosso país, eram considerados cavalos peninsulares, basicamente um Andaluz. Foi então que, por volta dos anos 70, surgiu a ideia de criar um cavalo chamado Puro-sangue Lusitano (PSL). A ideia de criar o PSL resultou da necessidade de dar resposta à criação do Registo do Puro-sangue Andaluz, pois corria-se o risco de passarem a ser todos Andaluzes. Criaram-se então comissões que estabeleceram os padrões da raça e depois foi-se, de coudelaria em coudelaria, conforme a solicitação dos criadores, verificar se os seus animais se inseriam nos padrões definidos (Fragoso, 2007).

Em Portugal, após a oficialização do Registo do PSL, a selecção foi orientada pelo Estado, através da Associação Portuguesa das Raças Selectas e pela Coudelaria Nacional, que controlava todos os livros genealógicos das diversas raças de cavalos criados em Portugal. Dada a sua importância nacional, foi criada uma Associação própria para o cavalo Lusitano, a qual recebeu do Estado o controlo do seu Stud-book (Associação Portuguesa de Criadores do Cavalo Puro e Sangue Lusitano – APSL). Nos anos subsequentes outras raças fizeram o mesmo. As raças ou Registos Zootécnicos hoje reconhecidas oficialmente são o Puro-sangue Lusitano, Puro-sangue Árabe, Anglo-Árabe, Puro-sangue Inglês, Sorraia, Garrano, Português de Desporto e Cruzado Português. A institucionalização oficial do Stud-Book da Raça Lusitana foi sem dúvida, um passo decisivo na selecção da raça, ao condicionar a admissão de reprodutores à demonstração da posse de requisitos mínimos do respectivo padrão, dando origem a um criterioso e generalizado trabalho de selecção (Gamboa, Machado Faria & Santos, 2009).

Fragoso, em 2007, coloca em destaque que o estabelecimento da raça Lusitana teve um papel fundamental no desenvolvimento do sector equino em Portugal, levando também, por outro lado, à alteração da forma como estes animais passaram a ser encarados pelos proprietários e à consequente valorização do papel do Médico Veterinário. O reconhecimento de uma raça específica, permitiu a sua divulgação e, consequentemente, os criadores e desportistas estrangeiros passaram a interessar-se por ela e a vir adquiri-la a Portugal. De momento, o Lusitano está espalhado por toda a Europa, e não só, com criadores em Espanha, França, Inglaterra, Alemanha, Bélgica, Itália, Brasil, México, Canadá Sudeste Asiático e EUA.

3.3. REPRODUÇÃO EQUINA EM PORTUGAL

A reprodução de cavalos em Portugal mostrou nos últimos 25 anos um assinalável desenvolvimento, apresentando hoje, uma realidade completamente diferente de há 25 anos atrás. Ao longo destas décadas, o controlo reprodutivo foi chegando cada vez a mais coudelarias, sendo reconhecido como um valor acrescentado para os seus efectivos e uma preciosa ajuda, principalmente a nível da gestão reprodutiva das suas éguas.

“Estão na base deste “boom” três pilares principais (Duarte, 2008^a, p.1):

- a) O reconhecimento internacional das qualidades do cavalo Lusitano, com exportações periódicas expressivas a partir de 1984, nomeadamente para o Brasil; pela primeira vez, empresários brasileiros reconheceram o enorme valor dos nossos cavalos e ofereceram valores elevados, comprando grandes quantidades de animais da nossa melhor genética, tornando o negócio praticamente irrecusável.
- b) Entrada na Comunidade Económica Europeia em 1986 e consequente abolição das fronteiras, consentindo o livre-trânsito de animais e pessoas e, logo, abrindo o negócio à Europa;
- c) Gestão através das organizações dos criadores a partir de 1990 – neste caso da Associação Puro-Sangue Lusitano – do livro Genealógico da raça que proporcionou um significativo valor acrescentado aos animais.

Estes três acontecimentos levaram a uma preocupação acrescida dos criadores em melhorar a eficácia reprodutiva dos seus cavalos, resultando num investimento crescente em serviços veterinários nesta área.”

O acompanhamento reprodutivo na espécie equina em Portugal começa a fazer-se regularmente no início da década de 80 (Duarte, 2010, Comunicação Pessoal), em paralelo a uma crescente publicação de trabalhos sobre reprodução em cavalos, devido ao aumento do impacto económico do desporto equestre, das actividades lúdicas e do turismo associado à espécie equina. Contudo, só há meia dúzia de anos se começou a aplicar regularmente as técnicas de IA e TE em cavalos, em menor quantidade nesta última.

Há sete anos, mais especificamente a 31 de Março de 2003, deu-se o nascimento da AMVE, Associação de Médicos Veterinários de Equinos, com a finalidade de juntar médicos veterinários que se dedicam à Medicina Veterinária Equina, para que possam

discutir os problemas, anseios e perspectivas da classe (Fragoso, 2007). Entretanto, a APSL aprovou a IA com sémen refrigerado e com sémen congelado, respectivamente em 2001 e em 2004 (Robalo Silva, 2006). Em 2007, inaugurou-se o primeiro Centro Creditado de Recolha e Congelação de Sémen de Garanhões em Portugal, sendo o único centro Português autorizado e presente na lista da União Europeia.

Actualmente subsistem várias instituições, como a Fundação Alter Real e o Centro de Colheita e Congelação de sémen equino, da LusoPecus, que dispõem de um depósito de garanhões e sémen, respectivamente para reprodução em éguas particulares em que os criadores pretendam a sua cobrição ou inseminação, bem como Unidades de Reprodução Obstetrícia e Neonatologia, onde se procede aos trabalhos de reprodução das éguas dos proprietários que o solicitem. A Fundação Alter Real ainda dispõe de um controlo sobre todos os livros genealógicos e de um Laboratório de Genética Molecular onde, a partir de 17 marcadores moleculares, é possível confirmar a paternidade de todo o efectivo equino nascido em Portugal e no estrangeiro (raças nacionais). Como forma de credibilizar todo o sistema, é mantido sempre actualizado um Registo Nacional de Equinos (Costa, 2009).

No passado dia 18 de Junho de 2009 foi aprovada pela APSL e homologada pela Fundação Alter Real a 16 de Março de 2010, o registo de poldros provenientes de TE, com o limite de registo de 3 poldros/égua dadora/ano e com a limitação de que as éguas receptoras sejam PSL, registadas no livro da raça.

3.3.1. Década de 80: O Início

3.3.1.1. Palpação rectal

A impraticabilidade à época de meios radiológicos e laboratoriais a nível da medicina veterinária, fazia com que diagnósticos de gestação ou não-gestação, o controlo do ciclo éstrico, a nível do crescimento folicular, sua maturação e ovulação fosse feito quase exclusivamente por exames de observação e palpação transrectal. Neste procedimento, o útero, ovários e folículos são palpados directamente através da parede rectal (Jainudeen & Hafez, 2004a). A detecção da ovulação era estimada não apenas pelo diâmetro, mas também pela turgidez e pela proeminência do folículo dentro no ovário (Newcombe, 2007). A confirmação do início de gestação da fêmea baseava-se na assimetria dos cornos uterinos e flutuação do fluido alantóide (Jainudeen & Hafez, 2004a). Mais tarde a confirmação provinha da palpação do feto.

Esta técnica foi e continuará a ser o método de eleição. É barata, precisa e fácil de executar e o diagnóstico pode ser transmitido imediatamente ao criador. Newcombe

(2007) cita um dos exemplos da vantagem da palpação em relação à ultrasonografia: um folículo aparece grande à ultrasonografia, mas se localizado mais profundamente no estroma este vai parecer mais pequeno e menos proeminente à palpação, tornando a predição da ovulação à palpação muito mais rigorosa. Esta técnica não tem só vantagens. Erros podem ocorrer na confirmação da gestação, aquando de uma má involução uterina (cornos assimétricos), existência de piómetra e morte embrionária (falso erro), etc. e na avaliação do folículo ovulatório onde todo e qualquer diagnóstico depende da sensibilidade inerente a cada médico veterinário, onde apenas clínicos experimentados conseguem fazer diagnósticos mais precocemente e com menor margem de erro.

3.3.1.2. Monta natural

O tipo de reprodução mais habitual à época e, bastante comum ainda nos dias de hoje, era a cobrição das éguas por monta natural, quando o macho e a fêmea realizam a cópula em liberdade, sem a interferência do homem. Embora seja economizadora de mão-de-obra e possibilite melhor aproveitamento dosaios, tem os inconvenientes de dificultar o conhecimento do dia de cobrição, aumentar a possibilidade de acidentes com o garanhão e diminuir o desempenho do mesmo e favorecer a transmissão de doenças da reprodução.

“O quadro dessa altura era caracterizado, segundo nossa experiência de então, por um enormíssimo número de saltos por égua e por poldro nascido (em algumas coudelarias chegavam a ser mais de oito. No que diz respeito ao garanhão e com éguas com mais de 10 éguas, os cavalos no pico da época e em cobrições dirigidas, chegavam a fazer 14 saltos por semana (2/dia)” (Duarte, 2007c, d; p.1).

Pela mesma altura, por exigências dos médicos veterinários e também dos proprietários, o mercado que gravita á volta deste sector começou a perceber que lentamente se instalava uma nova realidade, começando também a corresponder gradualmente. Duarte (2010, comunicação pessoal) afirma que começam a aparecer registados medicamentos adequados ao tratamento das várias patologias reprodutivas, bem como material apropriado às necessidades veterinárias (espécies, luvas, vaginas artificiais, etc.) principalmente os de consumo corrente, que outrora só eram possíveis por importação antecipada de países externos, ao mesmo tempo que evidencia uma fotografia de uma palpação rectal sem o auxílio a luvas. Perante esta

situação, e também por questões legais, o trabalho decorria em ritmo muito lento e impunha uma série de limitações.



Figura 9 – Imagens representativas das dificuldades da década de 80.

Legenda: A – Médica Veterinária com luvas cirúrgicas, únicas luvas disponíveis na época para palpação rectal; B – Médico Veterinário a executar palpação rectal sem luvas (Imagens gentilmente cedidas por Duarte).

Outro facto que comprova as limitações à época é quando Barrisco em 1982 teve a necessidade de improvisar os cateteres de IA, adaptando as bainhas para “Pistolet Cassou”, usados na inseminação das vacas, com sémen acondicionado em palhinhas de 0,05cc, 10cm de tubo de borracha que para além de compensar o seu comprimento insuficiente, facilitava a conexão à seringa, onde injectava 5 a 10cc de sémen que se mostraram eficientes para a IA em equinos, necessitando porém de maiores cuidados por parte do inseminador por serem mais rijos e consequentemente poderem provocar lesões quando usadas de forma indevida. (Faria, 1991a).

Nesta época, em Portugal, começam a surgir diversos trabalhos apoiados no cavalo, realizados por nomes como Barrisco, Potes, Barbosa, Papa, Alvarenga, Abreu, Vieira de Castro, etc., destacando-se, Barrisco (1982) que desenvolveu um modelo de vagina artificial, “modelo Universidade de Évora”, com que durante três épocas de cobrição fez com êxito uma centena de colheitas (Faria, 1991a).

3.3.2. Década de 90: Primeiros Avanços

3.3.2.1. Ultrasonografia

“A utilização da ultrasonografia, em Medicina Veterinária, tornou-se prática comum no início da década de 90 com o aparecimento em Portugal dos primeiros ultra-sons aplicados à espécie equina” (Duarte, 2008a, p.1).

A aplicação da ultrasonografia para o estudo da reprodução animal representa um avanço tecnológico que revolucionou o conhecimento da biologia reprodutiva (Blanchard et al., 2003; Duarte, 2008b), ao ponto do instrumento se tornar uma peça fundamental, quase indispensável para veterinários e cientistas (Blanchard et al., 2003). Todo o cenário anterior modificou-se, onde a qualidade de trabalho e as novas informações recolhidas sobre a natureza dos complexos processos de reprodução dos animais, alcançaram preciosismos, hoje indispensáveis à boa persecução deste trabalho (Duarte, 2008). Em Portugal começa-se nessa fase a vulgarizar a ecografia, no acompanhamento reprodutivo da égua.

Para além de rápida, é uma técnica considerada não invasiva ou minimamente invasiva, portanto bem tolerada em animais não sedados. É capaz de fornecer informações relacionadas com a dimensão, contornos, topologia e arquitectura interna de diversos órgãos e estruturas e, não necessita de grandes medidas de protecção ao paciente e ao operador. O equipamento é de natureza portátil, facilitando o manuseio de animais geograficamente distantes, ou impossibilitados de serem transportados (King, 2006). É um dos métodos de diagnóstico por imagem mais versáteis e ubíquos, de aplicação relativamente simples e com baixo custo operacional. Contudo, exige interpretação no momento, treinamento constante e uma conduta participativa do utilizador, ou seja, depende muito da habilidade do operador e o custo do aparelho é elevado (King, 2006).

O objectivo da ultrasonografia não foi apenas primariamente fornecer um diagnóstico mas também, orientar o clínico em relação ao próximo passo na abordagem diagnóstica ou terapêutica do problema em questão (Mohamed & Abd El-Aty, 2010). Os achados ultrasonográficos associados ao histórico e sinais clínicos auxiliam a tomada de decisões, a escolha entre diversas abordagens como: cirurgias emergências, abordagem cirúrgica não-emergencial, tratamento médico conservativo, controle sonográfico de um achado inesperado e realização de outros procedimentos como punções aspirativas e biópsia por fragmento sob orientação sonográfica.

Na reprodução equina, esta técnica permitiu precisar de forma objectiva:

- O desenvolvimento folicular, a ovulação, indicando o tempo óptimo para o salto a inseminação/cobrição, optimizando a actuação do garanhão em todo o processo e aumentando enormemente as taxas de fertilidade até aí verificadas;

“Nos anos 80 a fertilidade raramente era superior a 50%, com o início da ultrasonografia e da reprodução assistida a fertilidade

raramente era inferior a 85%.” (Duarte, 2010, Comunicação Pessoal).

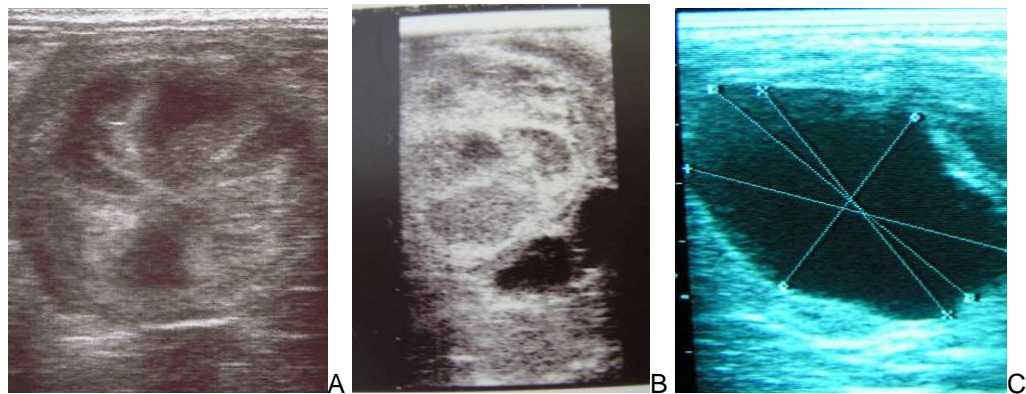


Figura 10 – Controlo ecográfico da égua em cio.

Legenda: A – útero com edema fisiológico; B – folículo luteinizado; C – medição de um folículo dominante (Imagens gentilmente cedidas por Duarte).

- A avaliação da fase da gestação, do número de fetos, da idade e da viabilidade fetal;
- O diagnóstico de gestação precoce, isto é, cerca de 12 dias após a inseminação é possível saber, mesmo antes do retorno ao próximo cio, o estado reprodutivo da égua, em relação à possibilidade de estar ou não gestante, de modo a identificar os animais que não conseguem conceber, melhorando assim a sua eficiência reprodutiva. Em caso da égua não estar gestante, há a possibilidade do Médico Veterinário induzir novo cio, iniciando mais cedo uma nova ovulação e, logo, diminuindo o intervalo entre cios. O diagnóstico precoce de gestação é essencial tanto para o manejo reprodutivo como para a produção económica.

Segundo Hafez et al. (2004), o diagnóstico precoce da gestação é requerido para identificar éguas vazias o mais rápido possível após cobrição ou IA, de modo que a perda de tempo e de produção por infertilidade possa ser reduzida por tratamento adequado ou refugo; certificar animais para venda ou com finalidade de seguros; reduzir gastos em programas de reprodução com utilização de técnicas hormonais dispendiosas; e colaborar no manejo económico dos rebanhos.

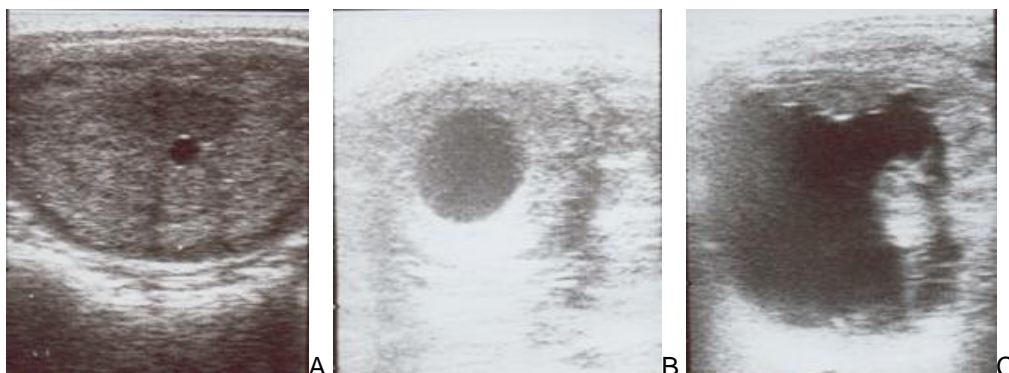


Figura 11 – Controlo ecográfico precoce da gestação.

Legenda: Controlo ecográfico precoce da gestação: A – gestação de 12 dias; B – gestação de 18 dias; C – gestação de 40 dias (Imagens gentilmente cedidas por Duarte).

- Na égua gestante passou a haver a possibilidade de acompanhar ecograficamente a gestação, nos primeiros 4 meses aproximadamente. Após essa fase deixa de ser possível devido ao tamanho do feto e ao aumento do fluído amniótico repleto de partículas ecogénicas.
- O diagnóstico de patologias do aparelho reprodutivo (Duarte, 2004; Samper, 2008b), como endometrites, piómetras, retenção placentária, não detectadas por palpação rectal, e dirigir tratamentos específicos, que vieram devolver muitas éguas à fertilidade, que há muito não pariam e por isso mesmo estavam condenadas a desaparecer reprodutivamente (Duarte, 2004).
- O diagnóstico de alterações anatómicas, como infantilidade e quistos. Na detecção precoce de animais com gestações gemelares, para evitar os efeitos negativos que as gestações gemelares têm no parto e na saúde da mãe.
- O conhecimento acerca do cio do poldro. Um cio tradicionalmente de referência, e com muita importância para o pessoal das coudelarias, onde por norma o salto era dado ao 9º e ao 11º dia pós parto, verificou-se através da ultrasonografia que a ovulação ocorria em média entre o 15º/16ª dias. Passou a obter-se muito mais informação não só sobre a involução uterina, mas também sobre a presença ou não de fluidos uterinos e até do tempo certo que decorre entre o parto e a primeira ovulação.

“A ciclicidade das éguas e o seu status ovário é assim perfeita e facilmente identificável, bem como patologias uterinas anteriormente insondáveis e que eliminavam muitas éguas por infertilidade, passaram a ser diagnosticadas e correctamente tratadas, devolvendo às éguas nova condição de fertilidade” (Duarte, 2007c, p.1).

3.3.2.2. Utilização de hormonas

A utilização de técnicas reprodutivas que possibilitam acelerar o ritmo reprodutivo das fêmeas ou sincronizar acontecimentos reprodutivos como as datas de cobrições ou de partos, teve início por volta da década de 90. Duarte (2010), em comunicação pessoal diz: foi na década de 90 que ocorreu, o início da aplicação de hormonas, na regularização dos cios. Assim, desde essa altura, a sincronização das ovulações e dos cios pode ser conseguida através da estimulação artificial. Antes, apenas se tinha acesso à estimulação natural, através da intervenção de factores ambientais, como o aumento da duração do número de horas de luz do dia na primavera ou através de uma alimentação equilibrada, que tem forte influência sobre a actividade hormonal ou ainda o chamado efeito-macho. O uso de hormonas também é aplicado em diversas patologias, éguas acíclicas, com diferentes graus de infertilidade ou na indução do parto. Apesar das vantagens, o uso de hormonas não substitui o controlo do desenvolvimento folicular, por via transrectal ou ultrasonográfica pelo Médico Veterinário (Duarte, 2010, comunicação pessoal).

Por outro lado, a identificação por ultrasonografia da condição reprodutiva da égua e, paralelamente, a sincronização dos cios com a utilização de hormonas, levou a uma optimização da gestão dos garanhões, diminuindo o seu esgotamento nos momentos mais cruciais da época de monta, quando ocorre uma acumulação de saltos. Tal facto levou a um aumento da eficiência reprodutiva dos garanhões, possibilitando a cobrição de um maior número de éguas sem aumentar o número de saltos e reduzindo muito o risco de acidentes.

3.3.2.3. Performance do Garanhão

É igualmente ao redor da década de 90 que os garanhões começam a ser postos em causa devido às suas fracas prestações reprodutivas. Até aí, e da parte dos seus proprietários, o garanhão era um elemento intocável no processo reprodutivo. Com um estatuto especial na coudelaria ou porque era adquirido sem nenhum controlo para a função a que se destinava – reproduzir-se – os “check up” à qualidade da sua actividade reprodutiva eram raros e, nalguns casos, mesmo inexistentes (Duarte, 2008a). Só há cerca de 10/12 anos se começou a analisar por rotina e de forma persistente, o sémen dos garanhões.

“A nossa experiência de campo leva-nos a trabalhar neste domínio há mais de 20 anos, pois sempre nos pareceu importantíssimo para quem tem a responsabilidade de “produzir poldros”, não ignorar uma das partes, cuja participação em todo o processo até é superior à outra: O GANHÃO E A QUALIDADE DO SEU EJACULADO.” (Duarte 2008^a, p.2).

Robalo Silva, em 2006, publica na Revista da Sociedade Portuguesa de Ciências Veterinárias um artigo sobre “*A Recolha e avaliação de ejaculados de ganhões em condições de campo*” onde a determinado passo dizia que em Portugal é pouco comum os clínicos de equinos efectuarem no campo exames da função sexual a ganhões que incluam a avaliação de sémen.

Este exame é parte essencial no sucesso da IA e será referido mais à frente.

3.3.3. Século XXI: Reprodução Assistida

A Reprodução Assistida consiste no acompanhamento veterinário da égua e do ganhão durante a época reprodutiva com auxílio de um conjunto de técnicas, que têm como principal objectivo viabilizar a gestação. Do ponto de vista construtivo, a reprodução assistida reflecte o avanço científico no campo da reprodução. Em contraposição, há uma produção legislativa portuguesa que se mostra muito lenta, na medida em que não consegue acompanhar a evolução da ciência. Exemplo desta morosidade legislativa é a aprovação do registo de poldros provenientes de técnicas de IA e de poldros PSL oriundos de técnicas de TE, até há bem pouco tempo proibida. O desenvolvimento da assistência reprodutiva por parte do Médico Veterinário modificou a ideia que até então os criadores tinham sobre reprodução e, como consequência as relações entre criadores e veterinários. Dessa forma surge a reprodução assistida, para aqueles criadores que desejam fazer criação mas que devido a problemas de infertilidade e outros, não obtém êxito na inseminação/cobrição das suas éguas. Com os avanços científicos, estes criadores encontram então a possibilidade da realização do seu desejo de formação de uma coudelaria com um grande número de descendentes de animais geneticamente superiores. Com vista a corrigir essas anomalias e viabilizar estes projectos, a engenharia genética desenvolveu métodos artificiais — as técnicas de reprodução assistida.

Para tirar pleno partido dos benefícios das tecnologias de reprodução assistida, é necessário não só a existência de equipas técnicas competentes, como também é preciso compreender a fisiologia básica dos sistemas reprodutor feminino e masculino, bem como os vários métodos de sincronização dos ciclos reprodutivos, avaliação da

quantidade e da qualidade seminal e o controlo eficaz das patologias do foro reprodutivo, em particular, o das enfermidades de transmissão venérea.

3.3.3.1. Acompanhamento dos animais para a Reprodução

O uso de técnicas de reprodução assistida tem ajudado os proprietários a produzir descendentes de éguas valiosas que foram, por qualquer motivo, consideradas inférteis, quando utilizadas técnicas de reprodução convencionais. Antes de submeter a égua, ao uso destas técnicas, o Médico Veterinário deve contudo ser capaz de identificar a causa subjacente de subfertilidade da égua (Coutinho da Silva, 2008). É da responsabilidade do mesmo, maximizar a saúde e a eficiência reprodutiva de todas as éguas e garanhões ao seu cuidado, para que as falhas de concepção e gestação sejam mantidas ao mínimo.

Em Portugal, fora de condições climáticas extremas, as éguas em regime de semi-estabulação, satisfatoriamente alimentadas, apresentam ciclos éstricos praticamente ao longo de todo o ano. (Faria 1991b). Igualmente Robalo Silva, Costa e Graça, (2009), afirmam que éguas mantidas à latitude de 39° e 12'N tendem a entrar em anestro durante o Inverno, embora éguas em boa condição corporal possam ciclar durante esse período. Também no garanhão foi observado que a função sexual não é uniforme ao longo do ano (Lopes da Costa, Duarte & Robalo Silva, 2007; Robalo Silva, Agrícola, Barbosa & Lopes da Costa, 2007). Entretanto, mesmo com uma distribuição de cio ao longo do ano, é recomendável que se adopte uma estação de monta. Desta forma, o manejo geral da criação torna-se mais fácil, pois a estação de monta concentra os nascimentos, e o garanhão terá possibilidade de passar por um período de descanso reprodutivo. Além destes aspectos, sem uma estação de monta definida, o desempenho reprodutivo dos garanhões que ainda estão no activo, a disputar competições, será negativamente afectado, e vice-versa.

Os equinos são “reprodutores de dias longos”, onde a sua capacidade reprodutiva máxima é atingida durante os períodos de aumento de luz natural (Primavera/Verão). Por norma, nas éguas, a época reprodutiva estende-se de Fevereiro a Junho havendo cerca de 50% de fêmeas que voltam a apresentar ciclos em Outubro e Novembro. (Faria 1991b). A produção de esperma no Puro-Sangue Lusitano está diminuída fora da época de reprodução (Lopes da Costa et al., 2007). No estudo sobre a “Variação sazonal do volume testicular, da produção e qualidade do sémen e do comportamento sexual de cavalos Lusitanos”, realizado por Robalo Silva et al., (2007) concluiu-se que os ejaculados colhidos no Inverno são qualitativamente idênticos mas quantitativamente diferentes dos obtidos nas restantes estações do ano. Isso significa que parece ser viável recolher e conservar sémen durante o Inverno mas que o

número de doses seminais por ejaculado será inferior ao conseguido com ejaculados colhidos na Primavera ou no Verão.

3.3.3.1.1. Égua

A sazonalidade sexual da égua e a consequente limitação de tempo para se obter uma égua em gestação em cada época reprodutiva, leva à necessidade de adoptar determinadas práticas a nível do maneio reprodutivo, para que, no final dessa época, o número de éguas gestantes seja o maior possível.

No sentido de maximizar a eficiência reprodutiva, todas as éguas devem passar por uma extensa examinação (Ricketts & Troedsson, 2007). Para o sucesso reprodutivo, é fundamental que as éguas estejam em bom estado sanitário e nutricional. O aspecto psicológico é menos crítico que no garanhão, mas a obesidade é um factor agravante para a fertilidade da fêmea. Quando mantidas estabuladas, a fertilidade tende a ser baixa, tanto em resultado da obesidade (falta de exercício e excesso de alimentos concentrados ricos em energia) como da falta de estímulos externos (luminosidade) para a manifestação deaios ovulatórios (Alvarenga, Carmo & Oliveira, 2009).

Este acompanhamento começa por um exame reprodutivo de rotina (Sousa, 2008). O exame inclui uma avaliação completa do estado de saúde da égua e da sua história reprodutiva, um exame físico geral para identificar algum problema físico evidente ou não (Sousa, 2008), um exame de conformação da vulva e do períneo da égua, vaginoscopia (o cérvix e a vagina são examinadas através de um espécuro), palpação rectal, ultrasonografia (Ricketts & Troedsson, 2007), citologia e cultura uterina (consiste numa análise ao útero para avaliar a presença ou não de inflamação ou infecção) (Ricketts & Troedsson, 2007; Sousa, 2008).

Independentemente dos problemas que a égua tenha, é muito importante a sua história reprodutiva completa e detalhada para planear o curso de acção a seguir. Deve ser desenvolvido um plano coordenado de gestão com base no historial do desempenho reprodutivo da égua (Shertich, 2005). Por exemplo se é a primeira vez que a égua é coberta, se de todas as vezes que foi coberta ficou gestante, se de todas as vezes que ficou gestante teve um poldro, se os partos foram normais, etc. (Sousa, 2008). Igualmente importante é ter conhecimento dos tratamentos prévios, achados de exames, resultados de testes de laboratório (Shertich, 2005) e conhecer as datas em que a égua foi coberta no ano anterior pois ficamos a conhecer melhor o seu ciclo reprodutivo (Sousa, 2008).

Durante o acompanhamento reprodutivo da égua, o veterinário, pode deparar-se com duas situações: éguas inférteis e éguas imaturas reprodutivamente. Estas éguas

representam uma perda económica e genética substancial para a indústria do cavalo (Coutinho da Silva, 2008).

a) **Éguas inférteis:** Uma parte do efectivo equino nacional é composto por éguas idosas, subférteis ou inférteis, ou até mesmo improdutivas. “A criação tem vícios tradicionais que complicam, impondo a reprodução dos seus animais mais velhos, e à partida menos aptos para a função.” (Duarte, 2010, Comunicação Pessoal). Porque não têm outras, ou porque são melhores “mães”, ou porque não querem usar éguas de competição, ou só as usam após o término da sua carreira desportiva. Duarte (2004), ainda acrescenta que o problema é que o útero destas éguas já tem reduzida capacidade de contracção, tem fraca drenagem linfática, apresenta líquido, quistos, muitas têm incompetência cervical e reacção ao sémen como se de corpo estranho de tratasse. É nosso dever, enquanto veterinários avisar que a égua será um problema e terá custos adicionais.

Bosh, Powell, Shelton e Zent (2009b) num estudo realizado sobre a eficiência reprodutiva de éguas do Kentucky, concluíram que a idade da égua tem um impacto significativo na capacidade de ficar gestante, de manter a gestação e de produzir um poldro vivo. Acrescentando que em éguas com idades compreendidas entre 14 e 18 anos, a perda embrionária precoce é a causa principal destas éguas diminuírem a produção de um poldro vivo. No mesmo seguimento Morris & Allen (2002) e Bosh et al., (2009a) afirmam que a idade da égua e seu “status” reprodutivo exercem influências importantes sobre as taxas de gestação e parto. Esta classe de éguas deve ser considerada, e manipulada, como uma classe problema, que representa prejuízos económicos para o criador. Nestas éguas, a causa de ainda não ter entrado na estação de monta, deve ser identificada e, para isso, recomenda-se uma avaliação reprodutiva completa nesta categoria de éguas (Shertich, 2005), por volta de dois meses antes do início da estação de monta. O exame reprodutivo envolve:

- Avaliação do estado geral da égua: a conformação básica deve ser considerada para determinar se a égua é adequada o suficiente para suportar o acto de reprodução e se ela não vai passar nenhuma das suas anomalias de conformação severa, por exemplo, anormalidades nos membros posteriores (University of Kentucky (Uk), 1998a).
- Exame externo: detecção da presença de exsudados (indicativo de infecção), tamanho e forma do clítoris (hermafroditas) (Shertich, 2005), posição dos lábios da vulva (éguas propensas a pneumovagina) (UK, 1998a; Shertich,

- 2005; Ricketts & Troedsson, 2007). Palpar o sistema mamário, no sentido de evidenciar mastites, abscessos, traumatismos ou neoplasias (UK, 1998a);
- Exame por palpação rectal do aparelho genital feminino: procurando-se identificar sinais de infecção uterina e/ou de distúrbios no ovário (tamanho do ovário, folículos anecóicos, corpos lúteos persistentes, tamanho dos cornos uterinos) (Shertich, 2005; Ricketts & Troedsson, 2007);
 - Exame da vagina, através do espéculo vaginal: é importante para avaliar o formato do colo do útero, pois este constitui uma forte barreira contra contaminantes externos. Detectar irritações crónicas e presença de líquido como em caso de urovagina (urina na vagina) (Sertich, 2005; Ricketts & Troedsson, 2007);
 - Recolha de material para exame bacteriológico: para determinar causas de infecção. Identificar organismos como *Streptococcus* β -hemolíticos, *Escherichia coli*, *Pseudomonas* (65% *P. aeruginosa*) e *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus* α -hemolíticos, *Equuli Actinobacillus*, *Salmonella enteritidis*, espécie *Pasteurella*-like, e aureus, *Enterobacter*, *Acinetobacter*, *Proteus*, *Citrobacter*, *Alcaligenes* e *Aeromonas* spp (Shertich, 2005);
 - Biópsia Uterina: avaliar a capacidade da égua para levar a termo a gestação; avaliar o padrão, carácter e localização da inflamação que indicam se a reacção é crónica ou aguda e também a gravidade da inflamação; verificar se existe fibrose (fibrose periglandular pode ser um factor de morte embrionária precoce), etc (Sertich, 2005; Ricketts & Troedsson, 2007).

As principais causas de infertilidade neste tipo de égua são: cio prolongado, cio anovulatório, cio falso, anestro de lactação, diestro prolongado (retenção do corpo lúteo), falhas na ovulação, desequilíbrio nutricional, idade da égua, quistos uterinos, problemas crónicos associados à genitália tubular (piómetra, fibrose endometrial), abortos espontâneos, endometrites, etc., (Jainudeen & Hafez, 2004a; Ricketts & Troedsson, 2007).

Na classe das éguas inférteis incluem-se também as éguas usadas intensivamente em desporto. Nesta categoria de éguas, as hipóteses de conceber e produzir um poldro em determinada época reprodutiva são dificultadas pela: (1) disparidade entre a sua estação reprodutiva e a imposta para efeitos de corridas (meados de Fevereiro e início de Julho) (Morris & Allen, 2002); (2) reduzida disponibilidade de permanecerem com o garanhão; (3) dificuldade em alguns casos de expressarem os cios; e (4) pela tendência em desenvolverem pneumovaginas ou vaginites. Neste grupo de éguas é assim indicado a citologia e biópsia endometrial (Sertich, 2005).

b) **Éguas imaturas reprodutivamente:** As poldras de primeira cobrição representam uma classe difícil de ser manipulada, isto porque algumas delas demoram muito a demonstrar sinais de cio. Aquelas que não estão em competições equestres, entram normalmente em cio com mais facilidade. Entretanto, aquelas que vêm de treinos intensivos, e competições frequentes, tendem a necessitar de um período de 30 a 60 dias para se reintegrarem no sistema de criação. O ideal é as poldras iniciarem o serviço reprodutivo aos 30 meses de idade. O medo à proximidade do garanhão é típico nesta categoria de éguas. Portanto, para a identificação do cio, torna-se fundamental a utilização de um rufião de pouca agressividade sexual. A rufiação deve ser individual, e conduzida diariamente.

Nestas éguas, a palpação e a ultrasonografia rectal para avaliar a presença de um útero de tamanho e consistência normal, ovários activos e colo do útero funcional (Sertich, 2005) podem ser determinantes. Estes exames devem ser feitos idealmente antes do início da época reprodutiva de modo a poderem ser corrigidos alguns problemas que possam aparecer e deste modo o animal se apresentar à cobrição na melhor condição possível.

Após concluído o exame de início de época reprodutiva nestes grupos de éguas e avaliado o seu estado reprodutivo, as éguas são então acompanhadas ecograficamente ao longo do seu ciclo de modo a ser possível identificar e resolver eventuais problemas (Sousa, 2008). Segundo Duarte (2008a), o acompanhamento ecográfico apoia-se em 5 grandes passos: (1) diagnóstico inicial da actividade ovárica, tentando perceber se já existe ciclicidade e consequente actividade reprodutiva; (2) acompanhamento do crescimento e maturação do folículo dominante que entretanto se forma e desenvolve; (3) indução ou simples acompanhamento da ovulação; (4) preparação uterina pós inseminação, pelo uso de drogas uterotónicas ou lavagens uterinas, criando condições à futura implantação; e, (5) diagnóstico de gestação.

Poucas éguas são verdadeiramente inférteis, e com um diagnóstico preciso, tratamento racional e um maneio cuidadoso, a maioria pode realizar uma gestação com sucesso (Pycock & Mckinnon, 2007). Preparar estas éguas antecipadamente para a nova época de cobrição é essencial para maximizar as hipóteses de sucesso de uma gestação antecipada e para ajudar a prolongar a longo termo a carreira reprodutiva da égua.

Mais tarde, é igualmente importante o acompanhamento veterinário de éguas em início de gestação. Éguas gestantes devem ser manipuladas de modo diferente de

éguas não-gestantes (Pycock, 2007a). A partir do momento que o diagnóstico de gestação é positivo, a égua deverá ser mantida numa pastagem de boa qualidade forrageira, e suplementada com misturas minerais adequadas, evitando exercícios que exijam esforços extenuantes, os quais podem provocar a perda embrionária precoce, ou abortos mais avançados. Entre o quinto e décimo mês do período da gestação, deve-se evitar mudanças na dieta. A égua deve ter acesso a um alimento concentrado que equilibre as suas exigências nutricionais, pois o feto encontra-se na fase de maior desenvolvimento neste período (Hafez & Hafez, 2004; Pycock, 2007a).

Devem ser feitos novos exames ecográficos para monitorizar o desenvolvimento da gestação, para verificar a ausência de uma gestação dupla ou de perda embrionária. Após os 60 a 70 dias de gestação, o aborto normalmente já pode ser detectado, sendo por isso importante novo diagnóstico de gestação (Pycock, 2007a).

Quando a égua atinge o término da gestação, esta deve parir em boas condições físicas, a fim de suportar o stress do parto e, posteriormente, o da lactação. Caso a égua esteja em boas condições físicas e clínicas após o parto, e caso este tenha ocorrido normalmente, há quem aproveite o primeiro cio pós-parto, o cio do poldro. A taxa de concepção de éguas paridas cobertas no cio do poldro é menor do que as cobertas após esse período (Hafez & Hafez, 2004).

Após paridas é importante avaliar a involução uterina por palpação rectal e ultrasonografia; realizar um exame vaginal manual para verificar se o tracto reprodutivo foi traumatizado durante o parto; realizar uma avaliação completa do colo do útero; e, éguas que tenham tido problemas de parto (distócias, retenções de placenta, etc.) requerem uma avaliação mais extensa. Todas as éguas, têm uma endometrite pós-parto passageira durante a involução uterina e, portanto, citologia e biópsia uterina fornecem informações úteis (Shertich, 2005; Pycock, 2007a). Este controlo é importante para evitar maiores problemas no início da próxima época reprodutiva.

3.3.3.1.2. Garanhão

Também igualmente importante é a informação sobre a fertilidade do garanhão que cobriu a égua, independentemente de ser cobrição natural ou inseminação com sémen fresco, refrigerado ou congelado. O reprodutor macho em todas as espécies – e na equina não foge à regra – tem uma importância decisiva no decorrer das estações reprodutivas. O garanhão até aqui esteve esquecido na equação da fecundidade, apesar de ser responsável por metade do resultado em cada reprodução. O macho reproduz-se várias vezes, fazendo depender do seu desempenho o saldo final da época. Para além disso representa também um património genético de grande

importância no futuro da coudelaria e nas expectativas do seu proprietário. No entanto, porque as pessoas têm a crença equivocada de que não há nada que se possa fazer para influenciar a fertilidade do garanhão, que ignoram a sua contribuição (Duarte, 2007c).

Um garanhão com fertilidade deficiente aumenta em muito o custo de produção de poldros que surge por aumento das despesas da égua (ex: cobrições extras, transporte de éguas para reprodução extra, exames/tratamentos veterinários extras, etc.), por custos de manejo desperdiçado associado com o suporte de éguas que não produzem poldros e por redução do rendimento (penalizações nas vendas, poldros nascidos tardiamente de éguas que não ficaram gestantes no início do ano, perdas por não se produzir um poldro e perdas por cobrições não produtivas) (Blanchard, 2007).

O impacto económico associado com a reprodução de um garanhão com baixa fertilidade pode ser substancial. É assim fundamental que o Médico Veterinário assegure que esta componente, tão ou mais importante que a outra, como já vimos, possua o melhor estatuto higio-sanitário. Este estatuto deve ser assegurado não só no começo da estação de monta como também durante a época sempre que se justificar uma decisão desta natureza (Duarte, 2007). A maioria dos reprodutores seleccionados para avaliação incluem aqueles que foram recentemente comprados, os que estão prestes a entrar na estação de monta, em que se suspeita redução da fertilidade, e garanhões jovens que vão entrar na sua primeira estação reprodutiva (UK, 1998b).

A fertilidade de um macho reprodutor não está somente relacionada com a produção de espermatozóides, com a viabilidade e capacidade fertilizante dos espermatozóides ejaculados, desejo sexual e habilidade de cobrir mas consequentemente, com todos os factores que possam influenciar estes últimos (Blanchard et al., 2003). Basicamente, o condicionamento reprodutivo do garanhão deve visar a manutenção da sua saúde física e mental (UK, 1998b). Do ponto de vista físico, quaisquer desequilíbrios nutricionais, doenças infecciosas, ou outras injúrias, podem provocar um declínio na fertilidade (Blanchard et al., 2003; Blanchard, 2007). A falta de exercícios regulares provoca a obesidade, e torna os garanhões mais nervosos. Do ponto de vista psicológico, o mais importante no garanhão, é realizar os procedimentos da cobrição segundo as normas correctas de condução da monta (Cosinha, 2010, Comunicação Pessoal).

Por economizar mão-de-obra, a monta natural ainda se utiliza nas coudelarias nacionais, mas para assegurar a saúde do garanhão e a viabilidade do seu ejaculado, é indispensável o controlo da monta durante a época reprodutiva, evitando-se acidentes e a ocorrência de distúrbios ejaculatórios, etc.

Monta natural controlada, é quando há interferência do homem, que leva a fêmea em cio ao macho para acasalamento programado. O macho permanece separado do rebanho. É vantajosa no sentido em que: (1) facilita o conhecimento do dia de cobrição; (2) diminui a possibilidade de acidente com o garanhão; (3) possibilita o controle geral da reprodução, com a programação das cobrições e partos, e uma maior identificação de problemas reprodutivos; e (4) possibilita um melhor aproveitamento do garanhão. Contudo, acarreta uma maior perda de cios e maiores despesas com mão-de-obra e com instalações (Duarte, 2010, comunicação pessoal). Na monta controlada, a paciência do operador é essencial no processo de educação do garanhão jovem, visando o desenvolvimento da sua habilidade para servir as éguas. Nos momentos correctos, as punições devem ser aplicadas, predominantemente vocais, em associação aos contactos suaves na boca do garanhão, através do cabo do cabresto.

Cada garanhão possui a sua individualidade própria, exibindo determinados tipos de comportamento. Garanhões nervosos, e com maus hábitos reprodutivos, são produtos geralmente de um maneio deficiente (Cosinha, 2010, comunicação pessoal). O responsável pelo maneio reprodutivo deve ser um indivíduo de confiança e competente. Um bom garanhão é extremamente valioso e não pode ficar sujeito a cuidados inexperientes.

Há uma tendência evidente para o criador associar baixos índices de fertilidade com as éguas; quando o problema pode ser originário do garanhão. Uns meses antes do início dos serviços reprodutivos, o garanhão deve passar por uma avaliação reprodutiva completa, realizando-se o diagnóstico de eventuais quadros de sub-fertilidade e estabelecendo um tratamento em tempo útil (Sousa, 2008).

O conhecimento do historial do garanhão é parte indispensável de um exame reprodutivo completo. Essa informação deve ser obtida de forma metódica para garantir a integralidade das informações e evitar imprecisões (Blanchard et al., 2003). Informações relativas à libido, à capacidade de acasalamento, à fertilidade, a doença ou lesão prévia, e qualquer medicação administrada (Sertich, 2005) são indispensáveis para o sucesso reprodutivo.

O exame reprodutivo deverá incluir também um exame físico geral. A incapacidade física pode impedir o coito (Jainudeen & Hafez, 2004b). Qualquer condição, de conformação ou não, que prejudique a sua capacidade de montar as éguas deve ser verificada e corrigida antes que ele desenvolva problemas psicológicos e se abstenha da reprodução (UK, 1998b).

O exame físico do garanhão envolve, a detecção de eventuais defeitos físicos de conformação, considerados herdáveis, antes de se introduzir um novo garanhão na éguada (Sertich, 2005). A detecção de defeitos como: (1) cegueira, total ou parcial; (2)

prognatismo; (3) pescoço invertido; (4) dorso-lombo demasiadamente selado, lordose ou espinha de carpa; (5) desvios totais de aprumos como bursites, laminites, osteoartrites. Os últimos, quando localizados nos membros posteriores poderão, inclusive, afectar a habilidade do garanhão servir a égua (UK, 1998b). Os cascos deverão ser examinados, verificando-se o seu tamanho, formato e a presença de anormalidades diversas. A seguir cada membro deverá ser analisado detalhadamente, para a identificação de quaisquer lesões. Na presença de lesões, a dor impedirá que o animal desempenhe o acto da cópula normalmente (UK, 1998b; Jainudeen & Hafez, 2004b). A avaliação dos órgãos genitais externos e internos deverá ser também realizada para avaliar possíveis lesões (Blanchard et al., 2003). Irregularidades como a hipoplasia, monorquidismo e criptorquidismo são motivos primários de descarte do garanhão (UK, 1998b; Jainudeen & Hafez, 2004b). Muitos destes problemas, se diagnosticados precocemente e tratados correctamente, resultam num regresso à fertilidade normal. (Murchie, 2005).

O último estágio, e mais importante, do exame reprodutivo do cavalo na pré-estação de monta é a avaliação de sémen (Estrada & Samper, 2007). Juntamente com o modo como o garanhão executa a monta, este parâmetro compreende o exame de fertilidade propriamente dito. A libido deve ser vigorosa, resultando na erecção imediata do pénis, na presença da égua em cio (Blanchard et al., 2003). A qualidade seminal é determinada principalmente pelo volume do ejaculado, concentração espermática, mobilidade e morfologia, embora existam outros parâmetros de avaliação da qualidade seminal. A abrangência de um exame andrológico será provavelmente influenciada pelo tempo, economia e disponibilidade de um examinador qualificado (UK, 1998a).

Torna-se oportuno lembrar que a fertilidade aparente de um garanhão pode ser marcadamente influenciada pelos tipos de éguas que ele serve. Caso sejam éguas subférteis, ou se é um número grande de éguas, todas em excelente estado clínico e fisiológico, mas com um operador que não conduz correctamente o manejo reprodutivo, a fertilidade do garanhão poderá ser mascarada (Blanchard et al., 2003).

Em síntese, as causas mais comuns de infertilidade nos garanhões são: (1) as falhas de manejo; (2) as deficiências nutricionais, higiene e idade inadequadas; (3) distúrbios ejaculatórios; (4) indiferença sexual; (5) anormalidades espermáticas; (6) infecções genitais; (7) anormalidades testiculares; e, (8) o excesso de uso na reprodução (Alvarenga, 2007). A anormalidade clínica mais comum associada à incapacidade de monta é a claudicação (laminites, etc.), (Blanchard et al., 2003). A habilidade de um garanhão para copular normalmente (desenvolver uma erecção, montar sem hesitação, inserir o pénis, fornecer impulsos intravaginais e ejacular) deve ser avaliada

antes do garanhão ser considerado uma perspectiva satisfatória para criação (Blanchard et al., 2003).

“O acompanhamento da égua e do garanhão durante a época de reprodução por parte do veterinário, provocou relativamente ao passado, um significativo aumento da fertilidade, reduziu do efectivo garantido o mesmo número de poldros nascidos, garantiu menos acidentes, menos mão-de-obra e despesas com a alimentação, possibilitando uma gestão mais racional do efectivo.” (Duarte, 2007c, p.4).

Quando as práticas do manejo reprodutivo e o cuidado veterinário são bons, o valor ganho por se aumentar a produção de poldros por se obter mais cobrições vai ser maior que a despesa da gestão para aquele aumento (Ricketts & Teoedsson, 2007).

3.3.3.1.3. Consequências do não acompanhamento reprodutivo

O não acompanhamento reprodutivo antes/durante a época reprodutiva, impõe consequências. Além das razões já descritas que não optimizam as prestações da égua e do garanhão ao máximo, a ausência de acompanhamento reprodutivo irá ainda proporcionar as seguintes situações:

3.3.3.1.3.1. Indistincção entre quistos uterinos/gestação inicial

Os quistos são bastante comuns na égua, principalmente éguas velhas. Estes estão repletos de fluido e, portanto, a imagem à ultrasonografia aparece anecogénica., Podem variar entre milímetros e alguns centímetros (England, 2005), havendo possibilidade de confusão entre um quisto uterino e uma gestação inicial (Duarte, 2007). Para evitar estes problemas, é prudente assinalar o tamanho, forma e posição do quisto uterino antes da monta/inseminação (England, 2005; Shertich, 2005). Ao longo das semanas o embrião desenvolve-se e o quisto permanece inalterável. O acompanhamento reprodutivo nas semanas que antecedem e precedem a cópula ou inseminação são determinantes para confirmação de gestação ou não. A detecção de quistos anteriores à cópula/inseminação é importante não só para detecção de gestações falso-positivas como também para assegurar um melhor acompanhamento reprodutivo nestas éguas que por norma apresentam baixa fertilidade.

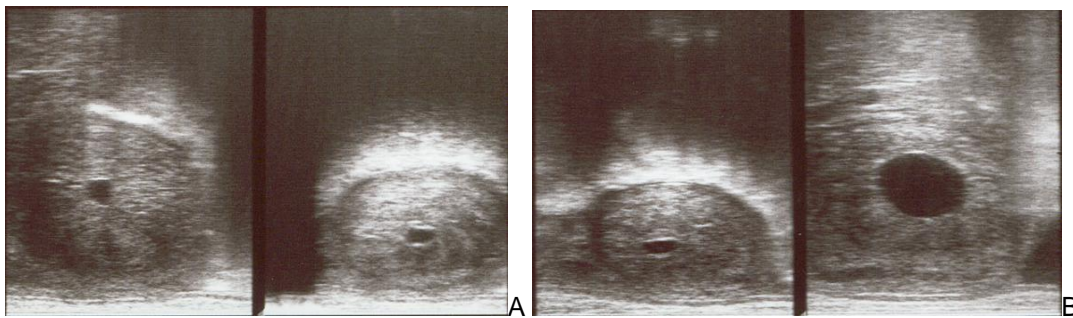


Figura 12 – Diferenciação entre um quisto uterino e uma gestação inicial.

Legenda: A – 1º controlo ecográfico da gestação; B – controlo ecográfico da gestação ao fim de algumas semanas (Imagens gentilmente cedidas por Duarte).

3.3.3.1.3.2. Impossibilidade de detecção de morte fetal

É comum ocorrer morte fetal após confirmação da gestação. Imagens da gestação após a formação dos microcotilédones podem ser necessárias para garantir a continuidade do desenvolvimento fetal e para avaliar a viabilidade fetal. A ausência de controlo reprodutivo após confirmação da gestação, impossibilitará ao MV detectar a morte fetal precoce e consequentemente, determinar a causa do aborto. Do mesmo modo, impossibilitará à égua a chance de voltar a entrar em cio, ainda na mesma época reprodutiva.

3.3.3.1.3.3. Impossibilidade de detecção de anormalidades fetais

Igualmente, o não acompanhamento reprodutivo após confirmação da gestação, impedirá o MV de induzir o aborto ou o parto prematuro quando estão presentes: feto morto e retido (mumificado); hidropisia dos invólucros fetais; parésia anteparto, hemorragia uterina; prolapso vaginal grave; gestações de animais jovens ou quando houver coberturas indesejáveis; múltiplas gestações (Jainudeen & Hafez, 2004c). A interrupção da gestação é mais fácil nos primeiros dois, três meses do período de gestação, porque os fetos são eliminados com a bolsa e o útero involui sem complicações. O que mais uma vez reforça a importância do acompanhamento reprodutivo no início da gestação

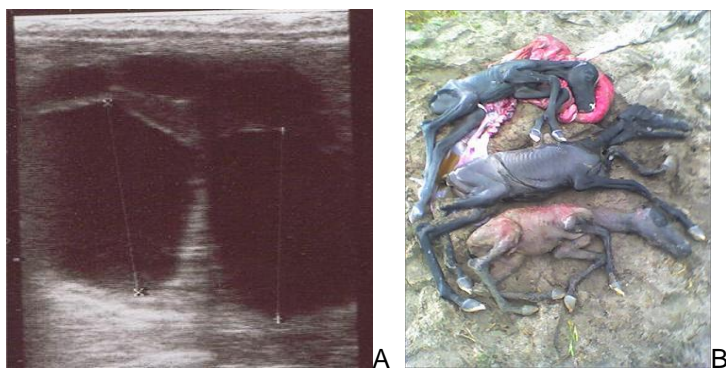


Figura 13 – Gestações gemelares.

Legenda: A – dois folículos dominantes à ecografia; B – Aborto de três fetos. Embora pouco comuns, éguas jovens podem experienciar ovulações duplas e são susceptíveis a ter uma tripla (Imagens gentilmente cedidas por Duarte).

3.3.3.1.3.4. Impossibilidade de detecção de patologias uterinas e vaginais

As endometrites são a principal causa de perdas na indústria de reprodução de cavalos. Causam perdas multi-factoriais devido ao número de éguas que ficam vazias, ao número de éguas que adquirem placentites, metrites pós-parto, atraso na reconcepção, abortos e neonatos com infecções (Rocha & Alvarenga, 2010). Além desta, muitas outras doenças como prolapsos vaginais, piómetras, retenções placentárias, placentites, problemas de parto etc., que impedem a gestação na égua. A não detecção precoce deste tipo de patologias antes do início da época reprodutiva, irá eliminar muitas éguas da reprodução.

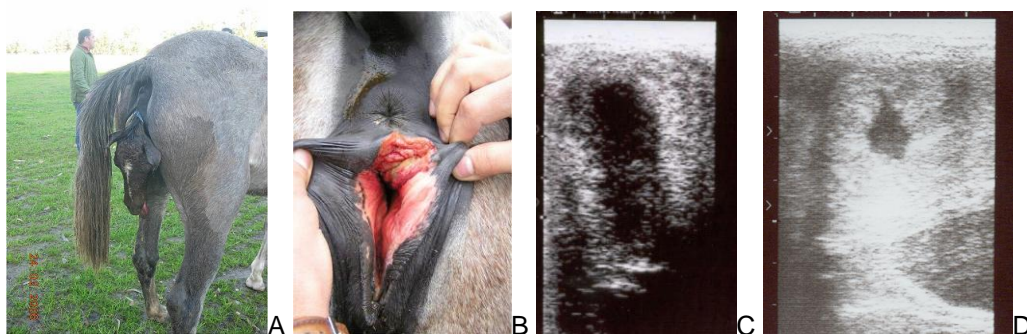


Figura 14 – Patologias uterinas e vaginais.

Legenda: A – égua com dificuldades durante o parto; B – patologia vaginal; C – imagem ecográfica de um útero com patologia; D – imagem ecográfica de um útero de uma égua com endometrite (Imagens gentilmente cedidas por Duarte).

3.3.3.1.3.5. Transmissão doenças venéreas bacterianas

Existem três principais agentes de enfermidades venéreas bacterianas no equino: a *Taylorella equigenitalis*, agente da Metrite Contagiosa Equina (Contagious equine metritis - CEM); a *Klebsiella pneumoniae* e a *Pseudomonas aeruginosa* (Wood, Cardwell, Castillo-Olivares & Irwin, 2006; Rocha, 2010; Rocha & Alvarenga, 2010).

As duas últimas bactérias são normalmente transmitidas pelo coito ou sêmen do garanhão contaminado, podendo existir como flora normal da genitália e nem sempre resultam em infecção (Rocha & Alvarenga, 2010; Rocha, 2010). No entanto alterações da flora normal podem originar o crescimento destas bactérias (Samper & Tibary, 2006).

Geralmente a *P. Aeruginosa* é multi-resistente a antibióticos (Rocha, 2010; Rocha & Alvarenga, 2010), por produzir um filme biológico que interfere na acção dos agentes antimicrobianos (Rocha, 2010). Os garanhões e éguas devem ser cuidadosamente testados para estes dois microorganismos de forma a evitar posteriores contaminações.

Entre as formas de controlo destes microorganismos, incluem-se técnicas ditas de “contaminação mínima” (Rocha, 2010; Rocha & Alvarenga, 2010), através da IA com volume reduzido do ejaculado, associadas a limpeza escrupulosa do pénis (Rocha, 2010).

O caso da *T. Equigenitalis*, agente da CEM, é particular e distinto. É um coco-bacilo gram negativo (Wood et al., 2006) e microaerófilo (Rocha & Alvarenga, 2010). Nunca se pode inseminar com sêmen de garanhões positivos a *Taylorella equigenitalis* (Sertich, 2005). Esta patologia está na lista de enfermidades de declaração obrigatória da OIE das Nações Unidas. A enfermidade provoca endometrite, sub-fertilidade e por vezes aborto nas fêmeas, sendo assintomática no macho (Rocha, 2010; Rocha & Alvarenga, 2010), o que aumenta a probabilidade de infecção das éguas. A CEM é altamente contagiosa (Rocha, 2010), restrita ao tracto reprodutivo (não sistémica), (Rocha & Alvarenga, 2010), disseminando-se eficientemente através do coito e da IA com sêmen de garanhões portadores (Rocha, 2010), através do contacto nariz com nariz ou nariz-genitália durante a rufiação, e ainda pelo uso de instrumentos contaminados, através das mãos de veterinários/tratadores após limpeza de períneo ou pénis de animais infectados, e mesmo através de água contaminada (Rocha, 2010; Rocha & Alvarenga, 2010). Os poldros que nascem podem ser infectados ao parto, e reiniciar surtos de CEM quando entram à reprodução (Rocha, 2010; Rocha & Alvarenga, 2010). A enfermidade é tratável e é possível que casos de CEM passem despercebidos pois éguas tratadas para endometrite recuperam e podem ficar gestantes (Rocha, 2010).

Assim, e dado os efeitos potencialmente devastadores da CEM, esta enfermidade merece um programa específico de vigilância e controlo (Rocha, 2010). O isolamento por cultura é um dos testes certificados, com colheita por zaragatoa no clítoris em qualquer fase do cio, no endométrio durante o cio e no garanhão na uretra, fossa uretral e mucosa do pénis (Rocha & Alvarenga, 2010).

3.3.3.1.3.6. Transmissão de doenças virais

Existem 3 doenças principais provocadas por vírus, a artrite equina, a anemia infecciosa e o herpes virus. É recomendada a triagem sorológica de éguas e garanhões antes da cobrição de modo a restringir os animais infectados da população para reprodução (Wood, et al., 2007).

A anemia infecciosa equina (Equine Infectious Anemia - EIA) também conhecida por febre dos pântanos é uma afecção cosmopolita dos equinos, causada por um RNA vírus do género lentivirus, da família Retrovírus. Uma vez instalado no organismo do animal, o vírus, nele permanece por toda a vida mesmo quando não se manifestam sintomas. A contaminação é feita principalmente por insectos sugadores. Já foram também comprovadas as transmissões congénitas (placentária), pelo leite (aleitamento), pelo sémen (acasalamento) e pelo soro-imune. A mucosa nasal e oral, intactas ou feridas, podem ser portas de entrada do vírus. O uso sem assepsia de material cirúrgico, por pessoas não-habilitadas, também aumenta a probabilidade da infecção. É uma doença crónica, embora possa apresentar-se em fases hiperaguda, aguda e subaguda. A sintomatologia caracteriza-se por episódios febris, perda de peso, debilidade progressiva, mucosas ictéricas, edemas subcutâneos e anemia (Carvalho Jr., 1998).

A Arterite viral dos equinos (Equine Viral Arteritis - EVA) é constituída por um vírus da família Arteriviridae é um importante agente causador de aborto em éguas e possui distribuição mundial. A sua transmissão é venérea e respiratória (Wood et al., 2007).

O herpes virus é um vírus comum que ocorre em populações de cavalos em todo o mundo. As estirpes mais comuns são EHV-1 e EHV-4. O EHV-1 pode originar doenças respiratórias, abortos e doenças neurológicas, enquanto que o EHV-4 normalmente provoca doenças respiratórias, mas também pode causar abortos (Rush, B.R., 2005).

3.3.3.1.3.7. Impossibilidade de detecção de tumores

Tanto no macho como na fêmea a presença de tumores, dificulta a reprodução destes animais, um exame clínico no início da época, descarta logo de princípio a possibilidade destes animais participarem na época de monta (Duarte, 2007).

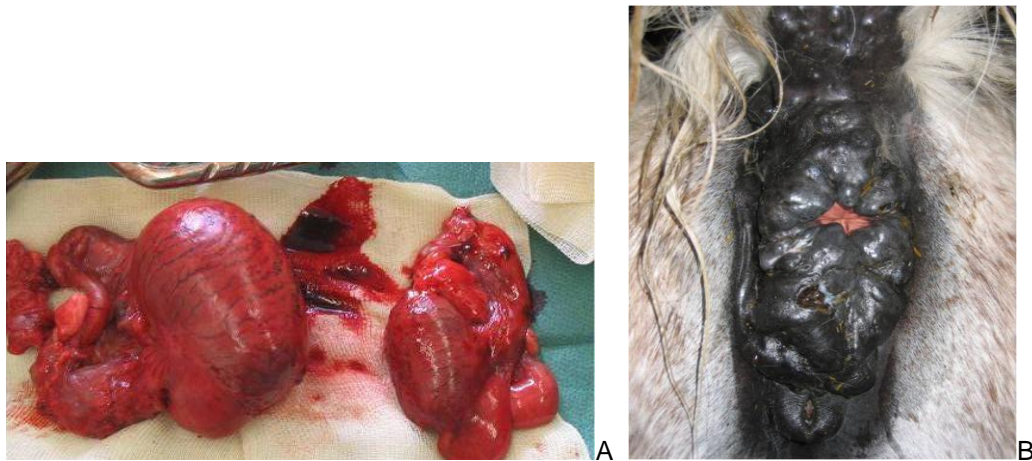


Figura 15 – Tumores

Legenda: A – tumor testicular; B – Carcinoma (imagens gentilmente cedidas por Duarte).

3.3.3.2. Sincronização hormonal do estro

O crescente interesse na aplicação de biotecnologias na criação de cavalos faz com que a terapia hormonal seja uma ferramenta importante para a maximização dos índices reprodutivos.

Como já referido anteriormente, a sincronização do estro das éguas através de estimulação hormonal teve início em Portugal na década de 90, mas o seu uso torna-se cada vez mais corrente actualmente por:

- Permitir com maior precisão o controle do período do estro e do tempo de ovulação (Alvarenga et al., 2009).
- Facilitar a implantação de programas de inseminação artificial e transferência de embriões;
- Optimizar a utilização de garanhões na estação de monta;
- Programar a monta de um grupo de éguas que vão ser cobertas por um garanhão com disponibilidade limitada (Bradecamp, 2007), facilitando o trabalho do veterinário e do criador (Squires, 2008).
- Optimizar a mão-de-obra (Alvarenga et al., 2009). Devido ao longo período do estro e a imprevisibilidade da data exacta das ovulações, o manejo das éguas

resulta num gasto de tempo e de mão-de-obra muitos extensos. A sincronização do estro é uma tentativa de otimizar a mão-de-obra e de ter maior precisão no controlo do período do estro e do tempo de ovulação.

- Quando o desempenho reprodutivo das éguas é baixo, a terapia hormonal é importante para assegurar a fertilidade e o correcto manejo da gestação. (Squires & McKinnon, 1987).

Existem três métodos básicos de sincronização do estro, o prolongamento da fase lútea, a indução da luteólise e a indução da ovulação (Bradecamp, 2007). Os dois últimos são os procedimentos mais comuns no manejo reprodutivo das éguas (Jainudeen et al., 2004; Samper, 2008b).

3.3.3.2.1. Luteólise

A Prostaglandina F2 α (PGF2 α) e os seus análogos são as hormonas mais usadas na reprodução equina devido ao seu efeito luteolítico (Alvarenga et al., 2009), causando assim a lise do Corpo Lúteo e permitindo o regresso ao estro (Faria, 1991; Bradecamp, 2007). Para que a prostaglandina seja eficaz na lise do Corpo Lúteo, é necessário que este apresente sensibilidade completa à prostaglandina, o que ocorre entre o quinto e décimo dia pós ovulação (Squires, 2008). Segundo Bradecamp, (2007), as éguas regressam ao estro 5 a 7 dias após a administração de prostaglandina e a ovulação ocorre passados 9 a 11 dias. Já Samper, (2008b), refere que as éguas regressam ao estro 3 a 4 dias e a ovulação ocorre 8 a 10 dias depois desse tratamento.

É importante ter em atenção que o tempo da ovulação após indução por PGF2 α pode variar entre 2 a 15 dias pós tratamento. Se a prostaglandina é administrada quando está presente um folículo grande, a égua retorna ao estro e ovula em 2, 3 dias. Se estiver presente um folículo em atresia no ovário no momento da administração, ao invés de ocorrer a ovulação do folículo ocorre uma nova onda de desenvolvimento folicular e a égua só ovula ao fim de 15 dias (Bradecamp, 2007).

Originalmente, o uso mais comum dado às prostaglandinas era o de induzir o estro em éguas com Corpo Lúteo persistente, bem como o de abreviar o próprio ciclo éstrico (McKinnon, 2009). Vários autores, como Faria (1991b), Squires (2008) e McKinnon (2009), ainda apontam o uso de prostaglandinas na sincronização dosaios, na indução da contractilidade do útero, para evacuação de fluidos, sendo por isso importantes na terapêutica das metrites, na indução do parto e na reabsorção embrionária com corpo lúteo pseudo-gravídico.

É importante referir que o uso de prostaglandinas tem a desvantagem, de poder levar à contracção da musculatura lisa do tracto gastrointestinal, respiratório e de outros órgãos, causando reacções clínicas ou efeitos laterais. Como consequências, as prostaglandinas podem aumentar a frequência cardíaca e respiratória, causando impaciência no animal, levar ao aparecimento de diarreias, bem como de sudações profusas em todo o corpo. No entanto todos estes sinais são de curta duração.

3.3.3.2.2. Prolongamento da fase lútea

As progesteronas exógenas simulam o diestro (Reed, Bayly & Sellon, 2004) e são normalmente usadas em programas de sincronização de forma a prolongar a fase lútea (Bradecamp, 2007). Além disso, também podem ser utilizadas para controlo da fase de transição, supressão do comportamento de cio, mas não necessariamente da ovulação (Mcue, 2009), e manejo de gestações de alto risco (Squires, 2008; Mcue, 2009).

A progesterona tem um efeito inibitório na libertação de LH pela hipófise anterior, sendo portanto de esperar que se for administrada por um período de tempo suficiente, de 15 a 18 dias, haverá regressão do CL (Bradecamp, 2007). É recomendável que os tratamentos sejam combinados com uma administração de PGF2 α no último dia da terapia para provocar a lise de qualquer CL remanescente. As éguas devem retornar ao estro dentro de 3 a 5 dias e ovular 7 dias após o tratamento (Squires, 2008).

A administração não é dolorosa e é fácil de aplicar, o que representa uma enorme vantagem e tem poucos efeitos secundários. Porém, poldras nascidas de éguas que tenham sido sujeitas a um tratamento com este fármaco podem atingir a puberdade mais cedo que o habitual, e raramente, nascem com o clítoris momentaneamente aumentado. Estes fármacos também aumentam o tónus cervical e o seu uso pode inibir a limpeza uterina fisiológica, que em último caso, pode levar ao aparecimento de endometrite e piómetra. Visto isto, as éguas susceptíveis a estas condições devem ser monitorizadas, enquanto o tratamento estiver a decorrer (Reed et al., 2004).

Para melhorar a sincronização do estro pode ser administrada uma combinação de progesterona e estrogénio (Bradecamp, 2007; Squires, 2008). Este conjunto resulta num feedback negativo na libertação de gonadotrofina mais profundo, que irá resultar numa inibição mais uniforme do desenvolvimento folicular (Bradecamp, 2007).

3.3.3.2.3. Indução da ovulação

Para a indução da ovulação e também para encurtar o ciclo éstrico, recorre-se frequentemente ao uso da gonadotrofina coriónica humana (hCG), à hormonal libertadora de Gonadotrofina (GnRH), a um análogo da GnRH, a Deslorelina ou à LH recombinante equina (erLH) (Bradecamp, 2007; Squires, 2008). A aplicação destas hormonas, presentes no mercado desde há alguns anos, provoca na égua a libertação das hormonas hipofisárias gonadotróficas LH e FSH.

A hCG é a hormona mais rotineiramente utilizada para esta finalidade (Bradecamp, 2007; Squires, 2008; Alvarenga et al., 2009; Rocha, 2010), pois comparativamente à GnRH actua directamente no ovário. A sua administração, quando se encontra presente um folículo pré-ovulatório igual ou maior do que 35mm numa égua em estro, resulta geralmente numa ovulação passadas 36 +/- 4 horas (Bradecamp, 2007; Samper 2008b), sendo que, segundo Duarte (2007), não é possível provocar a ovulação a folículos de dimensão inferior. (Duarte, 2007). Se quisermos precipitar a ovulação e provocá-la num tempo determinado (maneio indispensável na IA), é a partir de 35 mm que os folículos devem ser monitorizados regularmente, com periodicidade mais exigente se trabalharmos com sémen congelado, menos exigente se trabalharmos com sémen fresco ou refrigerado (Duarte, 2007), devendo a égua ser observada de 4 em 4 horas, no sentido de diagnosticarmos o momento da ovulação e podermos inseminar o mais próximo possível (Bradecamp, 2007; Duarte, 2007). É importante ter em conta que o crescimento diário dos folículos recrutados pelas ondas foliculares pode variar de 2,5 a 3,0mm (Ginther, 1985). Porém, quando se beneficiam da estimulação ovárica através de preparados hormonais, o crescimento folicular diário pode alcançar 3,0mm ou mais (Alvarenga et al., 2009).

Para as taxas de gestação serem maximizadas quando se utiliza sémen fresco, a inseminação deve ser realizada nas 48 horas que precedem a ovulação. Quando se pratica IA com sémen refrigerado, esta deve ser realizada nas 12-24 horas antes da ovulação e, no caso de ser sémen de garanhões subférteis ou sémen congelado, a máxima fertilidade pode ser conseguida se a inseminação for feita nas 12 horas que antecedem a ovulação e até 6 horas depois da ovulação. (Samper, 2008a).

O facto de hoje podermos com toda a precisão diagnosticar e controlar o momento da ovulação na égua, abre-nos a hipótese de poder substituir com sucesso o trabalho do cavalo na Natureza. (Duarte, 2008b). Prever o momento de ovulação é altamente desejável. As vantagens da previsão da ovulação incluem: (1) um pedido de sémen por ciclo para garanhões muito requisitados; (2) planear o transporte da égua, no caso da cobrição ser no local onde está o garanhão; (3) redução da contaminação uterina (especialmente em éguas com baixa *clearance* uterina ou alta susceptibilidade a

infecções uterinas); (4) aumentar a precisão da previsão do momento da ovulação quando se usa sémen congelado ou se usa sémen com pouca longevidade (Samper, 2008a); (5) maximizar o uso de garanhões com problemas de sub-fertilidade; (6) reduzir o nº de inseminações/cobrições por ciclo; (7) diminuir o número de inseminações em éguas problemáticas; (8) assegurar intervalos entre cobrições adequados para os garanhões; (9) a sincronização entre dadora e receptoras nos planos de transferência de embriões; e, (10) reduzir o trabalho e custos veterinários (Samper, 2008b).

Há, contudo, algumas desvantagens. Desde que se provou que a hCG tem propriedades antigénicas, estimulando o desenvolvimento de anticorpos que reduzem a eficácia desta hormona, tem-se usado GnRH como alternativa para a indução da ovulação em éguas cuja ovulação já fora estimulada por hCG duas ou mais vezes (Faria, 1991b; Bradecamp, 2007). O problema da GnRH existente no mercado, como destaca Faria (1991b) num dos seus trabalhos, conduz no equino à libertação de gonadotrofinas por períodos muito curtos e por isso nem sempre os resultados são satisfatórios nesta espécie comparativamente a outras.

Está agora disponível um análogo sintético, potente, da hormona libertadora de gonadotrofinas (GnRH), o acetato de deslorelina. A vantagem sobre a hCG é que, uma vez que apresenta um peso molecular mais pequeno, é menos antigénica, reduzindo a probabilidade de se desenvolverem anticorpos contra ela (Bradecamp, 2007). No entanto, é preciso referir que, numa pequena percentagem de éguas ocorre o prolongamento do intervalo entre ovulações (Samper, 2008b).

O protocolo normalmente utilizado e com o qual se obtêm resultados mais fiáveis inclui um tratamento primário com progesterona e estradiol-17 β , seguido da administração de PGF2 α e posteriormente de hCG ou de deslorelina para induzir a ovulação (Jainudeen et al., 2004; Bradecamp, 2007).

3.3.3.3. Recolha e avaliação de sémen

Com a expansão no mundo inteiro, nomeadamente na Europa e em Portugal cada vez mais, da utilização do sémen à distância, através de contratos celebrados entre criadores, e de gestações vendidas “sem fronteiras”, o exame da qualidade do sémen, o seu correcto manuseio e refrigeração/congelamento, ganham extraordinária importância. A partir desta altura (início século XXI), passa a fazer parte do arsenal de rotina do veterinário que se dedica a esta actividade. (Duarte, 2007c).

O espermograma, exame que avalia o sémen, é parte integrante do exame andrológico do garanhão que reflecte as actuais condições reprodutivas de um macho

e figura incontornável no trabalho do veterinário que faz acompanhamento reprodutivo como prática básica.

Existem muitas situações em que a avaliação do sémen deve ser efectuada: (1) sempre depois da recolha e antes da expedição; (2) antes da época de cobrição começar; (3) pelo menos uma vez durante a época; (4) para avaliação de um certo garanhão que irá ser incluído num programa de reprodução; (5) como parte da avaliação andrológica; (6) quando há suspeita de problemas andrológicos; (7) quando são atingidas baixas taxas de fertilidade ou quando estas não foram tão altas quanto esperadas; (8) para determinar a capacidade do sémen de determinado garanhão para a congelação e refrigeração (Estrada & Samper, 2007).

Não existe nenhuma avaliação ou parâmetro que isoladamente sirva para determinar o grau de fertilidade potencial de um garanhão, pelo que é recomendado o uso de vários testes para avaliar uma amostra (Estrada & Samper, 2007; Pycock, 2008). Para se ter uma melhor ideia sobre a qualidade de um ejaculado, o espermograma deve incluir no mínimo exames macroscópicos, como o volume, a cor e a opacidade do sémen, e exames microscópicos como a mobilidade, a concentração, a integridade, morfologia e o vigor dos espermatozóides (Papa et al., 2007).

Também é importante conhecer a variabilidade individual dentro da raça porque se sabe que a produção de espermatozóides e a fertilidade variam amplamente entre garanhões em qualquer período do ano. (Buiten et al., 2003; Sieme et al., 2004 – citado por Robalo Silva et al., 2009a).

Duarte (2007c,d) depois de ter realizado larguíssimas dezenas de espermogramas executados em garanhões dispersos por coudelarias de várias zonas do País, afirma que a variabilidade dos mesmos é enormíssima, sendo que não é possível padronizar um ejaculado tipo, como é mais facilmente exequível noutras espécies. Refere ainda que cada cavalo é um caso, e só depois das primeiras observações se poderá tirar conclusões acerca da proposta de trabalho a efectuar sobre cada animal.

Para se ter uma ideia aproximada da qualidade de determinado ejaculado, é necessário proceder a recolhas regulares, preferencialmente uma vez por dia de dois em dois dias durante toda a época reprodutiva. (Sieme, Katila & Klug, 2004). A qualidade do sémen é superior quando o garanhão se encontra sexualmente activo (Samper, 2008a), sendo que, o segundo ejaculado reflecte de forma mais correcta a qualidade do sémen do cavalo (Brinsko, Spooner, Blanchard, Love & Varner, 2004).

A concentração espermática, o volume, a cor e a percentagem de espermatozóides com mobilidade progressiva devem ser determinados e registados (Blanchard et al., 2003). É importante também não esquecer que os valores dos parâmetros de avaliação do sémen, são afectados por diversos factores como a raça, a idade, a nutrição, a altura do ano, o número e frequência de ejaculados, o repouso sexual, a

duração do tempo de excitação, o tamanho testicular, anomalias físicas, hormonais, doenças, etc. (Blanchard et al., 2003; Estrada & Samper, 2007; Papa et al., 2007).

A avaliação do sémen deve começar por ser feita a olho nu para descartar variações de cor ou de aparência. O sémen deve ter aspecto leitoso, ser de cor branca a “branco sujo”, não evidenciar coloração sanguinolenta, e ou contaminação por urina ou grumos (Blanchard et al., 2003; Estrada & Samper, 2007).

Embora o volume, por si só, não seja importante para a fertilidade, ele é usado para o cálculo do número de espermatozóides total contido no ejaculado (Blanchard et al., 2003; Ax et al., 2004a). Consequentemente, é essencial uma determinação precisa do volume (Ax et al., 2004a). O volume médio produzido por um garanhão é bastante variável (Blanchard et al., 2003; Estrada & Samper, 2007). Robalo Silva et al. (2007), determinaram em cavalos Puro-sangue Lusitano, que o volume seminal total livre de gel foi de 56.80ml e de 48.40ml na Primavera e Verão, respectivamente. Segundo Gamboa, Faria & Santos, (2009), o volume médio nos Puro-sangue Lusitano (PSL) é de $41,72 \pm 23,72$ ml. Desse conjunto de resultados podemos extrapolar que o volume do ejaculado de um garanhão varia em média entre 40ml a 60ml.

A avaliação da mobilidade é possivelmente o teste mais subjectivo. Na generalidade, reflecte a viabilidade da população espermática (Blanchard et al., 2003). Segundo Robalo Silva et al., (2007), nos cavalos PSL a mobilidade mantém-se praticamente inalterada em todas as estações do ano. A percentagem de mobilidade progressiva é calculada logo após a recolha de sémen, utilizando um microscópio óptico ou através de sistemas computadorizados de análise de mobilidade e pode ser executado com sémen fresco diluído. De referir que é de grande importância que todas as superfícies que vão entrar em contacto com o sémen, estejam a uma temperatura aproximada de 37° pois qualquer variação de temperatura pode afectar a mobilidade e levar a cálculos incorrectos (Estrada & Samper, 2007). Segundo Gamboa et al. (2009), a mobilidade progressiva nos PSL é de $41,60 \pm 16,58\%$ e segundo Robalo Silva et al. (2007), a mobilidade progressiva é de 42% na Primavera, 50% no Verão e Outono e 51% no Inverno. Idealmente a mobilidade de um ejaculado deverá ser sempre superior a 60% (Faria, 1991a).

A concentração dos ejaculados é um dos parâmetros mais importantes, em que o número total de espermatozóides está directamente relacionado com a concentração espermática e com o volume. Através da concentração podemos calcular o número de doses possível por ejaculado. Para avaliar a concentração podemos recorrer a um hemocítometro (câmara de Neubauer) ou a um espectrofotómetro (Blanchard et al., 2003; Papa, Alvarenga & Dell’Aqua, 2007). Segundo Gamboa et al. (2009), a concentração é de $241,26 \pm 166,35 \times 10^6/\text{ml}$. Robalo Silva et al., (2007), concluiu que a concentração em cavalos PSL é de $156,7 \times 10^6$ spz/ml, $164,97 \times 10^6$ spz/ml, $155,67 \times 10^6$

spz/ml e $166,37 \times 10^6$ spz/ml, na Primavera, Verão, Outono e Inverno, respectivamente. Idealmente, a concentração deverá situar-se entre 100 e 200 mil células por mm^3 , ou 100 e 150 mil células por mm^3 segundo Faria (1991a) e Ax (2004a), respectivamente. A aprovação de um garanhão nunca é definitiva para o resto da vida reprodutiva. Deve-se sempre levar em consideração que o animal logo após o exame pode vir a sofrer alguma afecção que o leve a uma depreciação na sua qualidade espermática. Por isso, o laudo não deve ser emitido com uma validade superior a 60 dias (tempo em que ocorre a espermatogénese mais o tempo epididimário) (Papa et al., 2007). A avaliação do sémen, associada ao exame clínico, é fundamental para a determinação do potencial de fertilidade do garanhão e exigido pela Associação Portuguesa de Criadores de Cavalos Puro-sangue Lusitano. A realização de espermogramas de forma regular e rotineira, na recolha de informação sobre a espermatogénese dos garanhões veio conferir a este sector da actividade reprodutiva, uma notoriedade que só recentemente adquiriu. (Duarte, 2007c).

3.3.4. Actualidade: Tecnologias da Reprodução Assistida

Ao longo dos últimos anos as ART tornaram-se mais eficientes na reprodução de espécies pecuárias. Novas oportunidades começam agora a surgir na aplicação destas técnicas na espécie equina, criando um impacto positivo sobre a indústria de criação de cavalos.

Durante a última década, o mundo testemunhou uma explosão de novas tecnologias reprodutivas e Portugal não foi excepção. Algumas dessas tecnologias já foram incorporadas na indústria dos cavalos, enquanto outras estão a ser incorporados de forma mais lenta e algumas nunca serão incorporadas (Squires, 2005).

As tecnologias reprodutivas começam a ser aplicadas como ferramentas para melhorar o desempenho genético da raça ou como um método de maximizar a rentabilidade da criação de cavalos (Long, Walker, Tang & Westhusin, 2003).

Segundo Coutinho da Silva (2008), os avanços na ART no cavalo tem sido impulsionados pelo desejo de: (1) estabelecer gestações em éguas que caso contrário seriam inférteis, (2) desenvolver meios para a multiplicação rápida de certas linhas genéticas (3), estudo da biologia da oogénese, fertilização e desenvolvimento embrionário e (4) fornecer material para outros avanços tecnológicos, tais como a micromanipulação ou a engenharia genética.

A aceitação e utilização destas tecnologias parecem estar a aumentar, como é evidenciado pela recente admissão de poldros provenientes de IA com sémen

congelado. A aplicação destas tecnologias tem um efeito imediato sobre a eficiência da produção animal e um efeito permanente sobre as gerações futuras, através da alteração dos diferenciais de selecção e da extensão da geração (Shelton, 1990). Determinar como ganhar vantagem genética a partir destas tecnologias minimizando as suas desvantagens tem constituído um grande desafio para os geneticistas (Nicholas, 1996).

A principal vantagem genética oferecida pelas tecnologias de reprodução assistida é o aumento da taxa de melhoramento genético (Nicholas, 1996). Outras incluem, o aumento do potencial de reprodução, ou seja, um menor número de progenitores são necessários para produzir um determinado número de descendentes comparativamente à monta natural. Geneticamente, isso resulta em maior intensidade de selecção que, por sua vez, pode resultar num aumento do mérito genético médio da prole. (Nicholas, 1996). As ART têm também um papel essencial a desempenhar na importante tarefa de conservação de recursos genéticos animais. Em particular, há uma necessidade urgente de métodos de criopreservação de gâmetas que possam ser aplicados em condições de campo isolado (Nicholas, 1996).

Infelizmente, elas têm o potencial de causar um aumento da taxa de consanguinidade e causar problemas em termos da variabilidade de resultados. Vários estudos demonstram que a consanguinidade pode alterar a qualidade e quantidade de gâmetas produzidos, assim como o comportamento sexual (Valera, Esteves, Oom & Molina, 2000).

Há variações substanciais em cada técnica de reprodução assistida, em complexidade, viabilidade, custo, indicação e taxas de sucesso (Coutinho da Silva, 2008). O custo do processo está directamente relacionado com a sua complexidade e custos de pessoal e de envolvimento ou não de laboratório. Os procedimentos exigem equipamentos caros e profissionais altamente treinados. Cada ART foi desenvolvida para contornar problemas específicos que afectam a fertilidade e, portanto, conhecer a complexidade, bem como os riscos destas técnicas, e fazer o diagnóstico da(s) causa(s) subjacente(s) de subfertilidade é crucial para um encaminhamento adequado da égua para a técnica de reprodução assistida menos complexa, mais adequada e com melhor sucesso para que a égua possa superar as causas específicas de infertilidade. (Coutinho da Silva, 2008). O sucesso da tecnologia, depende da atitude dos criadores e veterinários, e a relação custo/benefício da tecnologia. (Squires, 2005).

Usando uma mistura judiciosa de simulação aleatória e previsão determinística, os geneticistas conseguiram chegar a algumas conclusões importantes sobre as implicações das várias tecnologias reprodutivas (Nicholas, 1996) e chegaram a

sugestões bastante práticas sobre a melhor forma de utilizar algumas tecnologias reprodutivas, tendo em conta tanto as suas vantagens como as suas limitações.

3.3.4.1. Técnicas de Reprodução Assistida já em uso em Portugal

Várias ART têm potencial uso clínico no cavalo. Destas técnicas, apenas duas, a Inseminação Artificial e a Transferência de Embriões, têm actualmente uso clínico em Portugal. O objectivo que se segue é analisar as vantagens e desvantagens do uso destas tecnologias serem usadas para alcançar o melhoramento genético dos equinos.

3.3.4.1.1. INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL

Considerada até há pouco tempo uma técnica de resultados aleatórios, a IA na espécie equina conheceu nestes últimos anos um desenvolvimento espectacular. O progresso técnico realizado num lapso de tempo muito curto neste domínio deve-se em boa parte à pressão exercida pela procura de cavalos de desporto (Faria, 1991a). O uso da IA na espécie equina já data de algumas décadas, mas tem tido pouca expressão em Portugal. Embora se tenha observado um aumento da sua utilização na sequência da autorização do registo de poldros provenientes de IA pela Associação de Criadores de Cavalos Puro-sangue Lusitano (Robalo Silva, 2007). Estas mudanças foram seguidas de um aumento gradual de IA com sémen refrigerado e congelado, mas a percentagem de éguas inseminadas ainda é baixa e a IA está longe de ser o método principal de reprodução em cavalos (Lopes da Costa et al., 2007).

Na sua definição mais simples, a IA é a cobrição de uma égua com sémen que foi colhido de um garanhão, com auxílio a uma vagina artificial (Ax et al., 2004b). O sémen contido numa seringa é depositado dentro do corpo uterino anterior ou por inseminação profunda no corno uterino (Blanchard et al., 2003; Ax et al., 2004b; Papa et al., 2007), utilizando uma pipeta de inseminação estéril. O técnico deve usar uma luva esterilizada ou de plástico, limpa, protegendo todo o braço até ao ombro, quando estiver a passar a pipeta através do cérvix para o corpo uterino, onde o sémen será depositado (AxH et al., 2004b; Papa et al., 2007).

Blanchard et al., 2003; Ax et al., 2004b; Brinsko, 2006; Ricketts & Troedsson, 2007 e vários outros autores referem que, as éguas geralmente são inseminadas com 250×10^6 a 500×10^6 espermatozóides com mobilidade progressiva. Com sémen congelado e posteriormente descongelado varia entre 400×10^6 e 800×10^6 de espermatozóides (Squires, 2005) e idealmente com um volume de 10 a 30mL (Papa et

al., 2007). Grandes volumes de sémen não são vantajosos porque muito desse volume perde-se devido à dilatação do cérvix após a inseminação (Blanchard et al., 2003) e aumenta igualmente a reacção inflamatória da égua pós-inseminação (Ricketts & Troedsson, 2007). A fertilidade proporcionada pela IA pode ser idêntica à obtida com cobertura natural desde que a dose seminal contenha, pelo menos, 300 milhões de espermatozóides com mobilidade progressiva (Vidament et al., 1997; Gahne et al., 1998 – citado por Robalo Silva et al., 2007), não estejam presente doenças e quando são aplicadas boas práticas de manejo (Bearden & Fuquay, 1998). O método utilizado, o tempo ideal e a frequência de inseminação varia consoante o sémen utilizado é fresco, refrigerado ou congelado.

A IA tem como objectivo a obtenção de esperma nas melhores condições biológicas possíveis e preferencialmente com aumento das taxas de concepção. Autores como Bearden & Fuquay, 1998; Faria, 1991a; Blanchard et al., 2003; Ax et al., 2004b, enumeram vantagens e desvantagens no que concerne à IA:

- Permite melhor utilização dos garanhões e das éguas na época de monta. Todos os criadores pretendem rentabilizar as suas éguas, adoptando todos a mesma política: associar as qualidades desportivas de um garanhão às das éguas, a fim de aumentar a esperança na obtenção de um produto que responda aos desejos dos compradores (Faria, 1991a). Para além disso um garanhão muito solicitado sexualmente pode não ter a capacidade reprodutiva de cobrir todas as éguas. Num programa de IA o sémen pode ser recolhido 3 a 4 vezes por semana e ter os requisitos necessários (300 milhões spz/dose a 500 milhões spz/dose), para inseminar o mesmo número de éguas ou mais. Consequentemente, a IA é essencial após a sincronização do cio em grandes grupos de animais, ou seja, permite a cobertura de um maior número de éguas por época reprodutiva.
Com a IA, o número de saltos exigidos baixa para o mínimo, podendo sempre conseguir-se ejaculados ricos em espermatozóides e repartir as porções de sémen em doses suficientes, tendo cada égua a cobrir, a partir da mesma oferta biológica do sémen, igual hipótese de gestação (Faria, 1991a).
- Beneficia éguas que não possam ser cobertas. Todos os anos são apresentadas ao serviço natural éguas com deficiências físicas (laminites por exemplo) ou sem capacidade para o fazerem, ou porque é demasiado agitada ou porque tem um poldro. A IA veio restaurar o uso destas éguas na reprodução.
- Permite o uso de sémen de reprodutores incapacitados ou oligospermicos. Todos os anos, garanhões são feridos ou tem problemas de libido. A recolha de sémen diária diminui os efeitos da pressão durante o acto da monta e diminui as lesões.

- Possibilita a utilização de reprodutores já mortos, por meio de constituição de bancos de sémen congelado, por períodos indeterminados, colaborando na preservação de linhagens selectas e de reprodutores que à medida que vão envelhecendo a qualidade espermática diminui. A IA manipula o sémen de maneira a que o número correcto de spz/dose seja inseminado na égua.
- Reduz o risco de propagação de doenças sexualmente transmissíveis, pois não há contacto directo com a pele como acontece na monta natural. Faria, (1991a), afirma que a IA, aparece como um meio ideal para debelar uma doença que eclodiu na Europa, nestes últimos anos: a metrite contagiosa equina. Além disso, a IA ao contrário da cobrição natural, permite a adição de antibióticos ao sémen no momento da inseminação ou da recolha de forma a reduzir ou eliminar totalmente todo o tipo de bactérias da reprodução da égua e ainda, os extensores de sémen contém factores de suporte e protecção para os espermatozóides que podem melhorar as taxas de gestação de certos garanhões.
- Diminui as hipóteses de lesão. O sémen em programas de IA é geralmente colhido em dias alternados, logo há muito menos oportunidade de lesão. Além disso o sémen pode ser recolhido com o apoio de um manequim, podendo não haver necessidade de usar uma égua em cio. Não é só vantajoso para o garanhão mas também para éguas fisicamente inferiores ao garanhão e também para os funcionários envolvidos.
- Transmite segurança graças à eliminação de reprodutores de características inferiores e garanhões incapacitados para a colheita de sémen de qualidade, que com a IA deixam de servir éguas.
- Permite a aceleração do melhoramento genético; com IA o número de éguas cobertas com garanhões de alto valor zootécnico é multiplicado (Faria, 1991a). Pode ser utilizada para aumentar a intensidade de selecção do sexo masculino e, portanto, aumentar o mérito genético médio dos descendentes, ou seja, numa população fechada, pode traduzir-se num aumento da taxa de melhoramento genético (Nicholas, 1996).
- Permite a avaliação do sémen cada vez que é colhido. Com a cobrição natural só se pode assumir que o sémen estaria em boas condições depois da gravidez estar estabelecida. Com o IA podemos observar e medir parâmetros relacionados com a fertilidade cada vez que este é recolhido.
- Permite a cobrição de éguas no momento óptimo da concepção porque se pode refrigerar ou congelar sémen, preservando-o até a égua estar pronta a inseminar.
- Possibilita o transporte de sémen a grandes distâncias, que facilita a expansão de reprodutores de alto valor genético.

- Facilita o teste de paternidade numa série de condições ambientais e de manejo, melhorando, assim, a selecção (Ax et al., 2004b).
- Acelera a introdução de novos processos genéticos e possibilita meios úteis de pesquisa dos muitos aspectos da fisiologia reprodutiva de machos e fêmeas (Ax et al., 2004b).

Quando usada adequadamente, existem poucas desvantagens em sua utilização, mas a mais referida de todas é o dispêndio de tempo a verificar e controlar o estro das éguas. Para isso, é necessário contar com um pessoal treinado em técnicas adequadas e dispor de boas condições para o manejo das fêmeas durante a terapia hormonal, além da detecção do cio e a própria inseminação, principalmente em condições de campo (Ax et al., 2004b). Igualmente necessário é o equipamento especializado: vagina artificial, termómetros, recipientes aquecidos e equipamentos, gel não espermicida e equipamentos para medir a mobilidade (microscópio com platina térmica) e a concentração do esperma. Isso, associado a um laboratório bem equipado, implica custos significativos. Contudo, as despesas com os animais estão diminuídas, até porque permite múltiplas inseminações com um único ejaculado (Blanchard et al., 2003).

A IA também poderá trazer falhas e fraudes nos registos genealógicos dos garanhões. No entanto, é possível que estas falhas e fraudes possam ser detectadas, e portanto evitadas, através de algumas exigências, como a tipificação sanguínea dos progenitores, oferecendo este método garantia de paternidade (Faria, 1991a). É igualmente de salientar que o uso da IA num programa de melhoramento genético requer uma orientação técnica bem delineada afim de evitar os efeitos nocivos da consanguinidade, factor indesejável em qualquer espécie animal (Faria, 1991a).

Todas as inseminações devem ser executadas com técnica de contaminação mínima: com a égua devidamente contida, com a cauda ligada e elevada e a área entre a base da cauda e a comissura ventral da vulva muito bem esfregada, lavada e seca. Situação muito importante a levar em conta é que não só o coito, como também as manobras da IA são sempre hipotéticas fontes de contaminação intra-uterina, através de bactérias exteriores, que encontrarão ali óptimas condições de desenvolvimento, indo complicar o sucesso do trabalho (Duarte, 2007c).

Idealmente, devem ser feitas examinações regulares do tracto genital para prever com a maior precisão o tempo da ovulação e assim diminuir o número de inseminações, o que consequentemente diminui a contaminação uterina e a reacção inflamatória. O ideal é cobrir as éguas 48 a 24 horas (com sémen refrigerado e sémen fresco) antes da ovulação até 6 horas após ovulação (Blanchard et al., 2003).

3.3.4.1.1.1. Inseminação Artificial com sémen fresco

Para inseminação mediata, o sémen pode ser utilizado puro, mas convém diluir se for utilizado 20 minutos após a colheita. Já a utilização de sémen 2 a 6 horas pós colheita deve-se centrifugar para remover o plasma seminal. Se o sémen for utilizado depois de 6 horas após a colheita, aconselha-se a refrigeração (Rocha, 2010). Isto porque, à temperatura ambiente, o metabolismo dos espermatozóides e das bactérias permanece activo, produzindo radicais livres (O_2) e consequentemente, ocorre acidificação do pH e peroxidação dos lípidos, que resulta em danos celulares permanentes na membrana e núcleo. Já a 5°C, temperatura ideal de refrigeração do sémen, denota-se uma redução do metabolismo e por isso menores alterações do pH e menor peroxidação dos lípidos, que resultam no incremento da longevidade do sémen (Alvarenga, 2010b).

Alvarenga (2010b), refere que “para cada 10°C de redução na temperatura, o metabolismo celular é reduzido em 50%.”

3.3.4.1.1.2. Inseminação Artificial com sémen refrigerado

A utilização de sémen refrigerado, permite a IA até às 72 horas após colheita (Blanchard et al., 2003; Rocha, 2010) pelo que se utiliza na maioria das inseminações que se fazem em Portugal e na Europa, quando a égua e garanhão não se encontram nas mesmas instalações (Rocha, 2010). No entanto, colocam-se alguns problemas visto que existe uma variação racial e individual, ou seja, a tolerância do sémen à refrigeração é extremamente variável de garanhão para garanhão. (Robalo Silva e tal., 2009; Alvarenga, 2010b; Rocha, 2010).

A maioria dos reprodutores produzem sémen que mantém as suas qualidades até às 24 horas quando sujeitos a refrigeração havendo no entanto uma percentagem significativa que têm ejaculados que só às 48 horas sofrem decréscimos significativos da mobilidade progressiva (Blanchard et al., 2003; Rocha, 2010). Para além de outros aspectos, esta característica deverá ser considerada na decisão sobre o tempo que o sémen vai ser refrigerado ou se a congelação é o caminho mais eficiente (Rocha, 2010).

Contudo, Alvarenga (2010b) aponta algumas estratégias para melhorar a resistência do sémen à refrigeração: (1) dose inseminada deve rondar os 800 milhões de espermatozóides viáveis; (2) induzir a ovulação e inseminar 24h depois da indução; (3) inseminar antes dos espermatozóides completarem 24 horas de refrigeração ou adicionar novo meio após as primeiras 24h; (4) suplementar os cavalos com ómega 3

e L-carnitina (30 dias no mínimo); (5) utilizar o segundo ejaculado (1 hora após o primeiro), retirar o plasma seminal por centrifugação e adicionar diluidor.

Em concordância, Faria (1991a), afirma que o diluidor desempenha um papel decisivo no prolongamento da conservação do sémen. Para maximizar a sobrevivência dos espermatozoides, deve-se obter uma diluição de 1:4 de modo a assegurar que a concentração final de plasma seminal em sémen diluído é igual ou inferior a 20% (Blanchard et al., 2003).

Devido aos ejaculados dos equinos terem volumes e concentrações muito variáveis, é prática corrente a centrifugação como forma de uniformização. Esta mostrou ter um efeito positivo na intensidade da mobilidade dos espermatozoides (Faria 1991a). Trabalhos demonstram que, para garanhões cujo sémen apresenta baixa resistência à refrigeração, a centrifugação do sémen visando a retirada do plasma seminal é sempre benéfica. Contudo, não existem dados científicos consistentes que indiquem que tal seja necessário (Rocha A. 2010).

É também importante enfatizar que para a obtenção de bons índices de fertilidade, depois de processado o sémen deve ser acondicionado em recipientes especialmente desenvolvidos para este fim. A temperatura de refrigeração de 5°C é ideal para preservar melhor a mobilidade espermática e a fertilidade. Se a mobilidade espermática em sucessivas transferências é constantemente pobre e se a égua falha na concepção em reproduções sucessivas, é possível que o garanhão seja incapaz de produzir espermatozoides que sobrevivam à refrigeração e ao processo de transporte (Blanchard et al., 2003).

3.3.4.1.1.3. Inseminação Artificial com sémen congelado

A congelação do sémen tem o potencial de adicionar uma nova dimensão na indústria da reprodução do cavalo ao permitir a sua utilização teoricamente *ad eternum* (Blanchard et al., 2003; Rocha, 2010), para estabelecimentos de criação em todo o mundo (Blanchard et al., 2003), sendo assim o modo mais prático e barato de conservar a genética de garanhões (Rocha, 2010). Dessa forma, a congelação do sémen de cavalo é uma actividade em expansão, já muito solicitada pelos proprietários. Por rotina, a conservação é feita em azoto líquido (190°C) (Blanchard et al., 2003; Rocha, 2010). Um estudo realizado por Lopes da Costa et al. (2007) em cavalos Puro-sangue Lusitano concluiu que a estação afecta a produção de sémen mas não a congelabilidade do sémen. Isso mostra que o sémen pode ser colhido e congelado fora da estação de monta, desde que a frequência de colheita seja ajustada à produção diária de sémen (Lopes da Costa et al., 2007).

A IA com sémen congelado tem a vantagem evidente de não obrigar a um acompanhamento simultâneo das éguas, podendo inseminar-se anos após a colheita de sémen ter sido efectuada. O sémen pode ser obtido a partir de cavalos no estrangeiro, permitindo a venda de gestações em todo o mundo e em qualquer altura. A reprodução dos garanhões pode continuar enquanto competem, ou mesmo enquanto se recuperam de uma lesão ou doença e podem “eternizar” o garanhão após a sua morte, enquanto estiverem disponíveis as reservas. Diminui os custos de transporte, o stress e os riscos para a égua e o poldro (Goulburn Valley Equine Hospital - GVEH; Samper, Estrada & Mckinnon, 2007) bem como a transmissão de doenças contagiosas (Blanchard et al., 2003).

Assim, a possibilidade de conservação a longo prazo faz com que a IA com sémen congelado seja o método mais utilizado quando se pretende inseminar éguas mantidas em locais demasiado distantes do dador de sémen. A produção de sémen congelado para exportação está limitada a centros devidamente certificados para o efeito (Rocha, 2010).

Como tudo, este procedimento não tem só vantagens e antes de decidir há que colocar no outro prato da balança eventuais desvantagens, começando pelo facto de que a criopreservação e a descongelação do sémen danificarem a integridade dos espermatozóides. Se adicionarmos a isso o facto de que um número considerável de garanhões produz ejaculados de baixa congelabilidade, temos sémens que por vezes se obtém com características incompatíveis com uma elevada capacidade fertilizante. (Rocha, 2010). O sucesso da IA com sémen congelado é mais baixo do que com sémen fresco (Duarte, 2007c; Samper et al., 2007). Actualmente as taxas de gestação com sémen congelado são de cerca de 60% das com sémen fresco (Duarte, 2007d). A fertilidade do sémen do garanhão é reduzida pela congelação (Hafez, 2004; Samper et al., 2007).

Para além disso, implica custos. Embora se poupe no transporte do animal, as despesas veterinárias para o congelamento de espermatozóides são bastante elevadas e está dependente de vários factores, tal como se é para exportação ou não. Por outro lado, a inseminação com sémen congelado obriga a um trabalho mais intenso por parte dos Médicos Veterinários, no que concerne ao maneio das éguas, já que dada a menor viabilidade deste tipo de sémen há que assegurar que a IA é feita de modo a permitir a capacitação dos espermatozóides (6 horas) dentro do período viável do ócito após a ovulação. Assim, por regra, fazem-se ecografias repetidas em intervalos de 6 horas, iniciadas 24 horas após a indução da ovulação com hCG, inseminando-se logo que a ovulação seja detectada. (Duarte, 2007c; Rocha, 2010). Outro facto a ter em conta é a possibilidade de equívocos comuns com o criador. É importante esclarecer desde o início que as taxas de fertilidade não são altas e dos

risco inerentes quando se adopta esta técnica. A percentagem de morte embrionária precoce é alta (Samper et al., 2007).

Apesar das desvantagens e vantagens referidas, esta actividade continua a ser solicitada por criadores particulares e encontra-se nesta altura em Portugal em franca expansão, crescendo à medida que a informação vai circulando (Duarte, 2007c). Inversamente, as técnicas de criopreservação de espermatozóides em garanhões vão exigir mais precisão antes do procedimento poder ser considerado comercialmente viável em larga escala (Blanchard et al., 2003).

De modo a incrementar o sucesso desta técnica, há vários aspectos, referidos por diferentes autores, que veterinários e criadores deverão ter em conta:

- Nas condições clima/latitude de Portugal, as diferenças sazonais influenciam a qualidade do sémen após criopreservação, apontando-se o Inverno e a Primavera como as melhores épocas para a colheita. (Agricola, 2009).
- A avaliação do sémen utilizado para a IA deve ser obrigatória no caso do sémen congelado (Rocha, 2010; Duarte, 2010, Comunicação pessoal), antes da criopreservação e novamente após a descongelação (Hafez, 2004).
- A escolha do diluidor tem um papel decisivo no prolongamento da conservação do sémen, na protecção contra condições adversas de temperatura, facilidade de avaliação da mobilidade, melhor divisão por dose de inseminação e incremento das taxas de fertilidade (Faria, 1991a; Alvarenga, 2010b).
- A concentração do sémen é outro factor importante que quando tido em conta ajuda a aumentar a taxa de sucesso da congelação (Blanchard et al., 2003). Se o sémen após a descongelação apresentar baixa mobilidade deve ser aumentado o número de espermatozóides por inseminação.

Depois de inseminada, a égua deve ser reobservada atendendo a que há sempre a nível uterino, uma resposta inflamatória à deposição de sémen, que deve ser analisada de diferentes maneiras:

- Se trabalharmos com um ejaculado ou mesmo sémen fresco diluído, a reacção inflamatória produzida não afecta de sobremaneira os espermatozóides, visto que no ejaculado o plasma seminal (que contém ocitocina e prostaglandinas), para além de proteger os espermatozóides dos polimorfonucleares, provoca contracções uterinas, que eliminam de forma natural algum fluído inflamatório que se venha a criar, enquanto nesta altura muitos espermatozóides já se encontram “a salvo” no oviducto/trompa (Duarte 2007c; Samper et al., 2007). Estes

fenómenos devem ser bem acompanhados no pós-inseminação para que se decida correctamente sobre a necessidade de intervir (Duarte, 2007c).

- Com sémen congelado, e atendendo neste caso à inexistência de plasma seminal e à alta concentração de espermatozóides, verifica-se geralmente uma forte reacção inflamatória no pós-inseminação (Duarte, 2007c; Pycock, 2007b). Para garantir o sucesso é fundamental programar uma intervenção que não deverá ultrapassar os primeiros 2 dias pós ovulação, mas deve sim ser feita no mínimo cerca de 4/6 horas pós a ovulação/inseminação (Duarte, 2007c; Pycock, 2007b). Essa intervenção consiste num tratamento de fluidoterapia uterina, com fluido hipoecogénico, no mínimo 1L ou até o fluido sair límpido (Duarte, 2007c; Alvarenga, 2010b), com ou sem antibióticos, e acompanhada de injeção endovenosa de ocitocina (Duarte, 2007c; Pycock, 2007b). Se necessário repetir a administração de ocitocina 48h após a IA (Alvarenga 2010b). Caso a ocitocina não funcione, utilizar PGF2 α , até 12h após a ovulação (Alvarenga, 2010b). De acordo, Pycock, (2007b), atesta que éguas susceptíveis à acumulação de fluido são rotineiramente tratadas 4 a 6 horas após a cobrição de modo a aumentar a probabilidade destas éguas ficarem gestantes.

3.3.4.1.1.4. Inseminação Artificial com doses baixas de sémen

Nos últimos anos, foram realizados vários avanços no que toca ao conhecimento do espermatozóide e aos métodos de avaliação da sua capacidade funcional. Quanto mais conhecimento é adquirido relativamente ao sémen do garanhão, maior é a aplicação de novas tecnologias associadas ao sémen em situações clínicas (Matthews & Morris, 2007), como o desenvolvimento de procedimentos para inseminação de éguas com um número relativamente pequeno de espermatozóides. A inseminação em doses baixas tem o potencial para mudar a forma como os garanhões e o sémen são geridos (Squires, 2005).

As razões para a inseminação com doses baixas incluem: (1) a qualidade diminuída do sémen de garanhões velhos, que se tornaram populares com a idade (Squires, 2005) ou outros casos de subfertilidade (Lyle & Ferrer, 2005; Brinsko, 2006); (2) a disponibilidade limitada de palhinhas de sémen congelado de um garanhão; e, (3) o uso de espermatozóides sexados (Lyle & Ferrer, 2005; Squires, 2005) ou de sémen epididimal (Brinsko, 2006).

A inseminação com doses baixas de sémen equino pode ser feita por uma abordagem rectal guiada (inseminação profunda no corno uterino com um catéter flexível) ou com o uso de um endoscópio (Lyle & Ferrer, 2005; Squires, 2005).

Nas técnicas de inseminação padrão, as éguas são tipicamente inseminadas com 250×10^6 - 500×10^6 (Cap.12 - Blanchard et al., 2003; Ax et al., 2004b; Squires, 2005; Ricketts & Troedsson, 2007) e 800×10^6 espermatozóides (Brinsko, 2006), com sémen fresco e congelado, respectivamente. No entanto, melhorias na diluição e na gestão da égua permite que estas doses convencionais sejam reduzidas a pelo menos 100×10^6 espermatozóides de garanhões férteis para encher éguas férteis com bom manejo (Brinsko, 2006). Lyle & Ferrer (2005) e Squires (2005) descrevem estudos com bons resultados com inseminações de 25×10^6 espermatozóides congelados. Na inseminação com endoscópio foram igualmente obtidos bons resultados com 5×10^6 , 10×10^6 e 20×10^6 espermatozóides (Lyle & Ferrer, 2005; Squires, 2005; Brinsko, 2006). Assim, a inseminação profunda no corno uterino pode ser o método de escolha para um garanhão com excelente fertilidade mas baixo número de espermatozóides, em que apenas 25×10^6 a 50×10^6 espermatozóides são usados.

Centros Portugueses de Colheita e Congelação de Sémen Equino

Nos últimos tempos, o uso de técnicas de reprodução assistida pela indústria nacional de equinos tem vindo a aumentar de forma marcada, com vários centros a providenciarem serviços vários de reprodução assistida, tendo sido prestada pela primeira vez assessoria técnica para a implementação de um centro certificado de exportação de sémen, da LusoPecus.

Os requisitos oficiais para a aprovação de um centro de colheita e congelação de sémen equino são os seguintes: deve ser isolado, existência de boas práticas, pareceres positivos de várias entidades (Ministérios da Agricultura e do Ambiente); equipas técnicas reconhecidas e qualificadas; estatuto sanitário dos animais, nomeadamente controle da metrite contagiosa, arterite viral equina e anemia infecciosa.

Quando presente todos os requisitos necessários para a recolha de sémen, o centro examina e avalia a qualidade do ejaculado, processa sémen fresco, refrigerado ou congelado, armazena e faz a identificação administrativa do sémen (nome do garanhão, do proprietário, nº de doses, o nº do contentor e do canister, cor do copo de armazenamento e da palhinha que inclui identificação, entradas e saídas).

Actualmente, o único centro Português de colheita e congelação de sémen equino aprovado oficialmente e presente na lista da União Europeia é o da LusoPecus, na localidade de Porto Alto.

3.3.4.1.2. TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES

A exploração da técnica de TE tem sofrido um progresso rápido em todos os países desenvolvidos. A utilização comercial desta tecnologia reprodutiva pressupõe a existência de Unidades com meios adequados ao desenvolvimento de estudos na área (Robalo Silva, 1990).

Em Portugal, esta actividade foi consagrada no Livro genealógico da raça Puro-sangue Lusitano recentemente, com a limitação de 3 poldros/égua dadora/ano e a imposição de que todas as éguas receptoras têm de ser da raça Puro Sangue Lusitano, registadas no livro da raça. Esta técnica vai sendo cada vez mais do conhecimento e solicitação dos criadores e já se pratica com alguma frequência em algumas zonas do país.

A TE em equinos envolve a recolha e transferência de um embrião de uma égua dadora no início da gestação, (da qual se pretende aumentar o número de descendentes produzidos), através de “lavagens” intrauterinas para posterior implantação do embrião em fêmeas receptoras para completarem a gestação. (Jainudeen et al., 2004; Rocha, 2010; GVEH).

Este procedimento depende inteiramente da disponibilidade de uma fonte de embriões de boa qualidade e de um ambiente uterino apropriado na receptora no momento da transferência, dadoras e receptoras devidamente sincronizadas, de um método confiável para transferir os embriões (Jainudeen et al., 2004; Robalo Silva & Lopes da Costa, 1993), da fertilidade do sémen e da experiência do Médico Veterinário (Alvarenga, Carmo & Oliveira, 2009).

A égua dadora e o garanhão contribuem para o poldro com a sua genética e a égua receptora irá ajudar a determinar o tamanho do poldro ao nascimento, mas o seu crescimento subsequente é determinado pela sua própria genética e nutrição (GVEH).

Para selecção da égua dadora, deve ser considerado o seu histórico reprodutivo, a fertilidade, as directrizes do registo da raça e o número de gestações desejadas (Squires et al., 1999), o valor da égua e de toda a prole deve ser criticamente avaliada devido aos elevados custos da transferência de embriões (Blanchard et al., 2003). A égua dadora pode ser inseminada com sémen fresco, refrigerado ou congelado e a aplicação das técnicas de inseminação são idênticas às éguas destinadas a transportar os seus próprios poldros.

A própria selecção e manejo das éguas receptoras pode ser o factor mais importante no sucesso do programa de TE (McKinnon & Squires, 2007; Vanderwall & Woods, 2007), já que estas irão reconhecer o embrião e terão que fornecer as condições necessárias ao seu desenvolvimento. Considerada durante anos como a égua de “segunda”, com atenção e condições de espaço, sanidade e alimentação limitadas e

subóptimas, especialmente em relação às dadoras, hoje ocupa uma posição importante dentro das decisões de um plantel comercial de transferência de embriões (Alvarenga et al., 2009). Desta forma foram impostos critérios de selecção que, incluem tipo e tamanho, o peso óptimo (400 a 550 kg), idade de 3 a 10 anos, boa índole como a docilidade e habilidade materna, bom desenvolvimento mamário (Squires et al., 1999; Blanchard et al., 2003), ciclos éstricos normais, ausência de anormalidades uterinas e ováricas (Blanchard et al., 2003; Vanderwall & Woods, 2007) e sanidade uterina (Alvarenga et al., 2009), etc.

A sincronização entre o estágio de desenvolvimento do embrião e o tracto reprodutivo da receptora é um pré-requisito para que possa haver reconhecimento maternal da gestação após a transferência do embrião (Jainudeen et al., 2004; England, 2005; Rocha, 2010). Esta sincronização é geralmente conseguida pela selecção de receptoras que estão em cio ao mesmo tempo que a dadora, seja naturalmente ou como resultado da sincronização do cio (Blanchard et al., 2003; Mckinnon & Squires, 2007). É aconselhável tentar a sincronização da ovulação da égua dadora com pelo menos duas éguas receptoras (Blanchard et al., 2003). Podem ser escolhidas éguas que tenham ovulado um dia antes (+1) ou no dia da ovulação da dadora a três dias depois (0, -1, -2, -3) da dadora (Mckinnon & Squires, 2007). O dia da ovulação da dadora é denominado dia 0 (zero).

Em geral a recolha é feita trans-cervicalmente com apoio de um cateter de silicone de duas vias com balão, aos 6-7-8 dias após a ovulação, quando o embrião se encontra em fase de blastocisto (Blanchard et al., 2003; England, 2005; Mckinnon & Squires, 2007; Alvarenga et al., 2009; Rocha, 2010; GVEH). O facto de ser relativamente a direito e facilmente distensível torna o cérvix da égua em diestro, fácil de manipular para a passagem do cateter (Allen, 2005). Em éguas velhas (Alvarenga et al., 2009) e em éguas inseminadas com sémen congelado, a recolha é feita um dia mais tarde (Mckinnon & Squires, 2007), embora não se saiba a razão destes embriões, apresentarem desenvolvimento mais lento (Alvarenga et al., 2009). Em éguas com endometrite, os embriões devem ser recuperados o mais cedo possível (6º e 7º dias) inibindo assim a sua contaminação ou morte (Alvarenga et al., 2009). Recolhas de embriões pelo dia 9 ou mais são incomuns, pois o embrião já se encontra tão grande que a taxa de gestação após transferência diminui, provavelmente devido aos danos no embrião durante a manipulação (Hinrichs & Young-Ho, 2005).

Após colocação do cateter, o balão é insuflado, quando se encontra no interior do corpo do útero, de seguida o cateter é traccionado caudalmente para se ajustar no óstio cranial do cérvix, lavando-se os dois cornos simultaneamente (Blanchard et al., 2003; Squires et al., 2003; Alvarenga et al., 2009), por fluxo gravitacional (Hinrichs et al., 2005). O órgão é lavado três ou quatro vezes com solução salina ou lactato de

Ringer, previamente aquecido a 30 – 35°C (Blanchard et al., 2003; Hinrichs et al., 2005; Alvarenga et al., 2009). O conteúdo do líquido de lavagem varia muito de autor para autor, alguns acrescentam antibióticos ao conteúdo do líquido de lavagem. O útero é infundido com 1 ou 2 litros em cada lavagem, sendo massajado através do recto uma vez preenchido (Blanchard et al., 2003; Mckinnon & Squires, 2007; Alvarenga et al., 2009).

O sistema montado, poderá ter um fluxo de recuperação constante, sendo o fluido recuperado em grandes recipientes, ou ter o fluxo de recuperação interrompido com utilização de filtro milipore (Blanchard et al., 2003; Alvarenga et al., 2009) que permite escapar o líquido e reter os embriões recolhidos (Blanchard et al., 2003). O volume recuperado deve representar normalmente 95% a 98% do volume infundido. Quando se usa o filtro é importante deixar 20 ml de solução para evitar que o embrião desidrate (Blanchard et al., 2003; Alvarenga et al., 2009).

De seguida é feito o rastreio do embrião no copo do filtro e depois de localizado é removido por aspiração com auxílio de uma palhina acoplada a uma seringa e transferido para uma placa de Petri com o meio de lavagem. O embrião é lavado pelo menos 3 a 6 vezes sendo transferindo sequencialmente em diferentes gotículas na placa de lavagem (Blanchard et al., 2003). Depois de classificado é colocado numa palhina para ser inserido na égua receptora.

Para impedir que o embrião fique retido no algodão da palhina, aspira-se por esta ordem, uma coluna de líquido (1/4 do comprimento da palhina), uma pequena bolha de ar, uma segunda coluna de líquido (1/3 da palhina) com o embrião, uma segunda bolha e uma outra coluna de líquido (1/3 da palhina), (Blanchard et al., 2003; Reed et al., 2004; Alvarenga et al., 2009). Esta sequência minimiza os movimentos do embrião, evitando a sua perda e permitindo verificar a sua localização, e reduz a quantidade de líquido inoculado no útero da égua (Blanchard et al., 2003; Reed et al., 2004). Os embriões podem permanecer 2 a 4 horas a uma temperatura ambiente de 20°C a 25°C antes de ser transferido ou armazenado (Blanchard et al., 2003).

Quando da transferência para a égua receptora, a palhina com o embrião é montada no catéter aplicador, e este é introduzido numa “camisa sanitária”, que é um plástico que reveste o aplicador e que evita contaminações na vagina (Coutinho da Silva, 2008; Alvarenga, 2010a). Após a higiene da zona perineal e vulvar da égua receptora, introduz-se o aplicador com a mão a proteger a ponta, até ao 1/3 inicial do cérvix rompendo-se a camisa sanitária, para, em seguida, atravessar o restante cérvix até chegar ao corpo do útero onde o embrião é depositado (Blanchard et al., 2003; Mckinnon & Squires, 2007; Alvarenga, 2010a).

Os melhores resultados obtêm-se com receptoras que ovulam 1 a 2 dias mais tarde que a dadora, dando tempo para que haja “acertos” entre o desenvolvimento do

embrião e o ambiente uterino e permitindo assim o reconhecimento da gestação e a inibição da produção de prostaglandina e consequente luteólise (McKinnon & Squires, 2007; Rocha, 2010). O primeiro reconhecimento da gravidez da receptora pode ser determinado logo 5-6 dias após a transferência de embriões (dia 11-12 do embrião) (Alvarenga et al., 2009; GVEH). Podem ser esperadas taxas de sucesso pobres, caso a receptora tenha ovulado antes da dadora (England, 2005).

Vários outros factores podem contribuir para a morte embrionária precoce. Vanderwall (2008) classificou esses factores em intrínsecos, extrínsecos e embrionários. (1) Intrínsecos: idade materna, lactação, tempo de inseminação relativo a ovulação, local intrauterino de fixação da vesícula embrionária e anormalidades de cromossomas maternos; (2) Extrínsecos: tensão, nutrição, estação, palpação/ultrasonografia transrectal; manipulação do gâmeta e (3) Embrionários: incluem anomalias de cromossomas ou outras características inerentes do embrião.

A dificuldade do procedimento e da obtenção de taxas de sucesso está na organização e coordenação do manejo da égua dadora, da qualidade e sincronização da égua receptora e da técnica de transferência (Coutinho da Silva, 2008). Em condições ideais, pode-se esperar uma taxa de recuperação de embriões de 50% a 70% e uma taxa de sucesso de transferência de embriões de 50% a 70%, resultando em geral em taxas de gestação de 25% a 50% por ciclo (Blanchard et al., 2003), taxas estas que diminuem com a idade das éguas (Duarte, 2010, comunicação pessoal).

A TE é rotineiramente realizada pelo método não cirúrgico transcervical, embora técnicas de laparoscopia também sejam usadas com êxito. Em Portugal a TE por laparoscopia tem pouca expressão porque o método transcervical é mais simples, reduz as despesas, reduz complicações pós-transferência (Blanchard et al., 2003; Reed, 2004) e permite um melhor aproveitamento das receptoras (Blanchard et al., 2003). O uso desta técnica continuará a ser limitado, isto porque, segundo Hinrichs e Young-Ho Choi (2005) e McKinnon & Squires (2007) usando a transferência não cirúrgica as taxas de gestação aos 15 dias têm sido maiores de 75% por embrião transferido, nos últimos anos, para além de ser fácil e rápido de aplicar. Os mesmos autores ainda acrescentam que actualmente esta técnica está restringida a técnicas de reprodução assistida como transferência de oócitos (Oocyte Transfer - OT), injeção intracitoplasmática de espermatozóides (ICSI) e transferência de gâmetas intrafalópio (GIFT).

Autores como Blanchard et al., 2003; Hafez, 2004; Reed et al., 2004; Hinrichs et al., 2005; McKinnon & Squires, 2007, enumeram as vantagens e desvantagens da TE:

- A TE é para o sexo feminino o que a IA é para o sexo masculino – aumenta o potencial reprodutivo (Nicholas, 1996). Pode ser usada para aumentar rapidamente linhagens raras, para obter mais produtos de fêmeas valiosas (Hafez, 2004) e, portanto, para aumentar a taxa de melhoramento genético (Nicholas, 1996).
- Obtenção de gestações de éguas que não podem manter a sua própria gravidez, devido a certas patologias com as quais a sua vida estaria em risco se suportassem uma gestação até ao final ou durante e depois do parto: éguas com doenças uterinas, doenças sistémicas (tal como a doença de Cushing), lesões ou doenças músculo-esqueléticas (pélvis ou anca fracturada ou artrite severa, por exemplo). Com a TE o embrião pode completar a gestação em éguas receptoras em bom estado de saúde.
- Obtenção de gestações múltiplas por época. Embriões podem ser recuperados de éguas que frequentemente sofrem de gestações gemelares (que muitas vezes resultam em perdas).
- Obtenção de gestações de éguas com dois ou três anos de idade. Estas éguas imaturas reprodutivamente, são incapazes de levar uma gestação a termo, com a TE podem produzir embriões com uma boa taxa de sobrevivência em éguas receptoras adultas.
- Obtenção de gestações de éguas em competição, sem que as mesmas levem uma gestação a termo, o que as impediria de continuarem a ser utilizadas na competição. Anteriormente à TE estas éguas só produziam descendência pós-reforma. Actualmente, só têm que visitar o Médico Veterinário para recolha dos embriões a cada 19-21 dias.
- Permite a produção de embriões de éguas que faleceram ou foram eutanasiadas por razões médicas (Hinrichs et al., 2005).
- Permite que éguas com partos tardios na época reprodutiva produzam um embrião para o ano seguinte e sejam preparadas para parir cedo no ano subsequente, reduzindo o intervalo entre partos.
- Ajuda a compreender os aspectos fisiológicos fundamentais na reprodução equina.
- Provou ser de grande valor para projectos de investigação em que eram comparados efeitos em gémeos derivados de divisão de embriões ou de duplas ovulações.

Uma limitação da técnica é o elevado custo da mesma quando comparado com a IA, devido às múltiplas intervenções veterinárias necessárias e aos custos de sincronização dosaios. Em Portugal o custo de obter e manter éguas receptoras

(mínimo de duas por dadora), que devem ser animais no melhor estado e idade reprodutiva, parece ser uma das maiores limitações ao uso disseminado da TE (Rocha, 2010).

“Em Portugal, é uma actividade perfeitamente exequível com sucesso, que encontra à partida uma dificuldade de ordem logística, nem sempre fácil de contornar, relacionada com o facto das coudelarias não terem um número suficiente de receptoras disponível que, na altura de transferir os embriões, permita uma escolha alargada da receptora mais adequada, aumentando assim a probabilidade de êxito.” (Duarte, 2007c, p.5).

Hafez, (2004), refere que outro dos problema é que as taxas reprodutivas das dadoras são aumentadas à custa da redução das taxas reprodutivas das receptoras porque estas últimas permanecem frequentemente vazias por períodos prolongados até que um embrião seja transferido para elas. Por conseguinte, a taxa de endogamia também será substancialmente aumentada (Nicholas, 1996), pois os custos elevados da TE reduzem o número de animais usados seleccionando-os através das suas melhores características.

Éguas com anormalidades que impedem a concepção ou a manutenção embrionária precoce, como endometrites, lacerações cervicais irreparáveis, cicatrizes uterinas ou do oviducto após distócia não são boas candidatas a TE (Hinrichs et al., 2005). Nestes casos deve-se ponderar usar técnicas mais avançadas, como OT e ICSI.

Como todas as técnicas, estas dependem da experiência do Médico Veterinário. Para além de determinar a altura ideal para a deposição de sémen no útero da dadora, o técnico tem de saber reconhecer anormalidades que possam aparecer, tais como atraso na involução uterina ou folículos hemorrágicos que podem diminuir o sucesso da recolha dos embriões (Pycock & Newcombe, 1997). É também importante que o Médico Veterinário seja experiente nas técnicas de recolha dos embriões e de transferência para as receptoras a fim de se obterem taxas de gestação mais elevadas (Reed et al., 2004).

Enquanto a TE é bastante utilizada e aceite noutras espécies animais há questões importantes a ter em conta na indústria equina e que atrasam a aplicação desta:

- A fase folicular do ciclo éstrico é longa, tornando-se difícil sincronizar ovulações. Existem dificuldades em sincronizar as éguas, o que significa que é preciso um grande número de éguas receptoras, não ficando o processo barato.
- A recuperação de embriões em éguas inférteis é baixa, bem como de éguas em competição. Está experimentalmente verificado que o exercício físico diminuí a taxa de recolha de embriões, supostamente pelo efeito nocivo da subida da

temperatura corporal no adequado desenvolvimento do oócito, com consequentes falhas de fertilização ou mortalidade embrionária muito precoce (em fase de 2 a 8 células), pelo que se deve estar ciente que nestas duas classes de animais os resultados não expressam a máxima potencialidade da técnica (Rocha, 2010).

- Muitas vezes o verdadeiro potencial reprodutivo das éguas só é valorizado quando estas já são velhas e alguma da sua descendência já demonstrou ser dotada de uma performance superior (Duarte, 2010, Comunicação Pessoal), obrigando a um esforço por parte do Médico Veterinário na maximização da saúde reprodutiva da égua e na minimização das falhas de gestação e concepção.
- Nesta espécie, a TE não contribui em grande escala para a melhoria genética. Pois, se as éguas dadoras transportassem os poldros até ao final da gestação o número de poldros nascidos seria o mesmo se fossem as receptoras a transportar a gestação a termo. A contribuição da TE poderia certamente mudar se se tornassem disponíveis protocolos de superovulação para o cavalo (Aurich & Aurich, 2006).
- Mais uma vez é preciso referir a importância dos donos estarem informados das expectativas realísticas da técnica de TE antes de esta ser iniciada nas suas éguas. Devem estar cientes de que mesmo com uma égua nova e fértil, com um sémen igualmente fértil e com um Médico Veterinário experiente as melhores taxas de recolha de embriões são de 70% a 80%. Se o sémen utilizado for refrigerado ou congelado, as taxas de sucesso são quase sempre ainda menores (Squires et al., 1999).

3.3.4.1.2.1. Transferência de Embriões por contraste de raça

Um factor que abala toda a indústria equina em Portugal é a baixa fertilidade das éguas. Uma parte do efectivo nacional é composto por éguas idosas, subférteis, inférteis, ou até mesmo improdutivas. Em muitos casos esses animais de baixa produtividade apresentam alto valor zootécnico e genético. Nesse caso, é essencial o desenvolvimento de ferramentas que proporcionem o aproveitamento reprodutivo desses animais. A transferência de embriões por contraste de raça permite que raças de baixo valor zootécnico alberguem gestações de éguas com alto valor zootécnico.

Maioritariamente, utilizam-se éguas da mesma raça e de menor valor genético, visto que, em geral costumam ser do mesmo criador, ou seja, já adaptadas. Mas já há muito, que foram realizadas as primeiras experiências de transferência de embriões com cruzamentos entre pôneis e cavalos de tracção onde compararam o peso ao nascimento com a área dos microcotilédones placentários (Allen, Wilsher, Tiplady & Butterfield, 2004). A partir daí determinou-se que o tamanho e a categoria (virgens,

primíparas, adultas, velhas), são os factores que mais influenciam o peso ao nascimento dos produtos de transferência de embriões (Alvarenga, 2009), ficando a cargo dos proprietários que, dependendo dos seus objectivos para a TE, decidam as características das éguas receptoras. Assim sendo, desde que as receptoras correspondam pelo menos a estes critérios, a escolha da raça é irrelevante. Além de ter permitido a criação de modelos experimentais únicos, que revelaram a grande influência do ambiente uterino materno no desenvolvimento e nas funções hormonais do concepto (Allen, 2005), a TE por contraste de raça ainda alarga o leque de receptoras, que num país como Portugal poderá ser uma mais valia.

A aplicação da TE por contraste de raça, em Portugal, dificilmente será aplicada como rotina. Existe ainda a impossibilidade de registar poldros provenientes de TE, mas mais difícil será o registo de poldros provenientes de TE por contraste de raça, se a aprovação da TE pela APSL, tiver a limitação de que éguas receptoras sejam Puro Sangue Lusitano, registadas no livro da raça.

Tanto quanto é conhecido, nasceu pela primeira vez em Maio de 2010 o primeiro poldro proveniente de TE por contraste de raça. A receptora de raça irlandesa deu à luz um poldro Puro-sangue Lusitano. (Duarte, 2010, Comunicação pessoal).



Figura 16 – TE por contraste de raça em equinos.

Legenda: A – Poldro Puro-sangue Lusitanos; B – receptora de raça irlandesa e poldro PSL (Imagens gentilmente cedidas por Duarte).

3.3.4.2. Futuro: Novas Técnicas de Reprodução Assistida

Nas últimas duas décadas, as técnicas de reprodução assistida progrediram para além da IA e da TE e o uso clínico das tecnologias de reprodução assistida, com foco essencialmente na produção de descendentes de éguas e garanhões com fertilidade comprometida, tem agora possibilidades infinitas.

3.3.4.2.1. Técnicas com interesse e aplicabilidade clínica recente em Portugal

3.3.4.2.1.1. Refrigeração, Criopreservação e Transporte de Embriões

No nosso país, a inexistência de éguas receptoras continua a ser o principal factor limitante da TE, ou porque o proprietário não está devidamente informado e não tem éguas suficientes para receptoras, ou porque quer reproduzir todas as suas éguas, ou porque a manutenção das receptoras é cara e ter éguas suficientes para agendar uma proposta de transferência de embriões é um dos aspectos mais difíceis da TE no cavalo.

A criação de um centro de receptoras traria imensas vantagens, como o aumento da produção de cavalos com excelente genética e o avanço e aperfeiçoamento desta técnica em Portugal e ainda, segundo Alvarenga et al., (2009), uma melhor utilização destas receptoras, pelo desenvolvimento na aplicação de técnicas que permitam a preservação dos embriões até serem transportados aos centros. O embrião poderia ser colhido da égua pelos médicos veterinários, no local onde esta habita normalmente e, de seguida, transportado para outras instalações, onde as receptoras estivessem alojadas, deixando de haver a preocupação da proximidade das dadoras. Isto significaria que a transferência seria realizada por pessoas qualificadas e que as despesas de manter uma pequena quantidade de éguas receptoras seriam eliminadas (Mckinnon & Squires, 2007).

Também para os embriões estão disponíveis diferentes técnicas de preservação, a criação de um centro iria igualmente ajudar na aplicação dessas mesmas técnicas. Embora ainda não aplicada na clínica em Portugal, a preservação de embriões por curto período, ou seja, a refrigeração é uma solução que pode ser empregue rotineiramente. Vários trabalhos têm demonstrado a eficácia desta técnica, com taxas de gestação semelhantes às obtidas com embriões frescos (Alvarenga et al., 2009). Implica a colocação do embrião num meio de manutenção, que já existe no mercado. Se os embriões forem transferidos até 18 horas, pode-se utilizar um sistema de refrigeração de 14°C a 16°C (Alvarenga et al., 2009). Porém para o embrião permanecer viável por, pelo menos, 24 horas, recomenda-se um sistema de refrigeração passivo de 5°C (Blanchard et al., 2003; Mckinnon & Squires et al., 2007; Alvarenga et al., 2009), permitindo o transporte por meio terrestre ou aéreo (Blanchard et al., 2003). Na sua actividade, Alvarenga et al., (2009), têm observado que os embriões refrigerados recolhidos com 7,5 a 8 dias após ovulação apresentam melhores taxas de gestação.

Já o congelamento torna possível o armazenamento de embriões indefinidamente (Mckinnon & Squires, 2007; Alvarenga et al., 2009), possibilitando a manutenção da viabilidade embrionária durante viagens, importação e exportação (Alvarenga et al., 2009), ou mesmo aguardando a recolha de embriões de éguas dadoras e sua transferência para uma receptora quando for oportuno, minimizando assim o número de receptoras (Mckinnon & Squires, 2007; Alvarenga et al., 2009) e simultaneamente preservando importantes linhagens genéticas (Mckinnon & Squires, 2007). A técnica da congelação de embriões ficou protelada enquanto outros avanços foram feitos noutros campos da técnica de TE. Isto pode ser devido, em parte, à percepção da sua falta de aplicabilidade, uma vez que não havia possibilidade de se recolherem múltiplos embriões e, por outro lado, devido às restrições aplicadas pelos livros de registo das raças às transferências de embriões congelados (Mckinnon & Squires, 2007).

Os embriões seleccionados para a criopreservação devem ser da melhor qualidade e estar no estágio correcto de clivagem (Hafez, 2004). Por regra, autores como Alvarenga, Blanchard, Samper, Reed e Rocha indicam o 5º e o 6º dia após a fertilização como a altura ideal para recolher embriões para criopreservação. Isto porque o blástocisto equino perde a zona pelúcia ao dia sete e está rodeado por uma membrana glicoprotéica que lhe mantém a forma redonda e que é eliminada por volta do dia 21. A função da membrana é presumivelmente a de manter o embrião com formato esférico para poder circular entre os dois cornos do útero, processo essencial para o reconhecimento maternal da prenhez. Um defeito indesejável da membrana é o de dificultar a acção dos crioprotectores durante os processos de criopreservação do embrião (Rocha, 2010). Este facto, que demorou 20 anos a ser claramente identificado, levou a que a criopreservação de embriões só fosse retomada de forma sistemática nas últimas décadas. Hoje sabe-se que para congelar embriões a recolha deve ser feita 6 a 6,5 dias após a fertilização, quando a membrana embrionária está apenas parcialmente formada, havendo assim uma acção mais eficiente dos crioprotectores (Rocha, 2010). No entanto as taxas de recolha dos embriões de 6 dias são baixas devido à falha na identificação do embrião no meio de colheita, à perda do embrião durante o procedimento de colheita por causa do seu pequeno tamanho, à falha da obtenção do embrião na lavagem uterina causada pela sua grande gravidade específica ou devido à não descida do embrião para o útero no dia 6 (Mckinnon & Squires, 2007; Alvarenga et al., 2009; Rocha, 2010). Destes quatro pontos, os últimos dois são os de maior significado (Mckinnon & Squires, 2007).

Nas técnicas tradicionais de congelação, os embriões equinos são expostos a uma curva de refrigeração de 0,5°C por minuto. Este procedimento requer um equipamento especializado e 90 minutos para ser realizado. Na descongelação, o embrião deve ser

passado por uma série de soluções com diferentes concentrações, associadas a sacarose para ser re-hidratado antes de ser transferido para o útero da receptora (Hafez, 2004; Alvarenga et al., 2009). A TE imediata após a colheita tem maior sucesso seguido da criopreservação a curto prazo. As taxas de sucesso da transferência de embriões congelados continuam a dar resultados muito inconsistentes (England, 2005; Rocha, 2010). Mais pesquisas são necessárias para melhorar as taxas de gestação de embriões criopreservados de espécies domésticas (Hafez, 2004).

Em contrapartida ao método tradicional de congelação de embriões, surgiu a vitrificação. Têm baixo custo, pois não há a necessidade da utilização de máquinas de congelação e reduz significativamente o tempo de manipulação, requerendo menos de 15 minutos para realização de todo o procedimento (Alvarenga et al., 2009). Experiências recentes têm demonstrado uma significativa melhoria nos índices de fertilidade através da vitrificação de embriões. Durante a vitrificação, o embrião é rapidamente exposto a concentrações altas de crioprotectores, em três etapas, antes de ser introduzido no azoto líquido. A vitrificação é definida como a solidificação da solução sem a cristalização, com a elevação extrema na viscosidade durante a congelação (Alvarenga et al., 2009).

Na congelação são usadas baixas concentrações de crioprotector por longos períodos de exposição com diminuição de 3°C a 4°C/minuto e com formação de cristais de gelo. Na vitrificação são usadas altas concentrações de crioprotectores, com tempo de exposição curto e diminuição de 30.000°C/min, sem formação de cristais de gelo (Alvarenga et al., 2009). Hoje em dia já está disponível um *kit* para vitrificação de embriões, denominado de *Equine vitrification kit* (da Bioniche Animal Health USA) composto pelos 3 meios com diferentes concentrações de crioprotectores e por um diluidor. Para melhor precisão da técnica de vitrificação, também já está disponível um aparelho que realiza todo o processo. Na descongelação após vitrificação não há a necessidade de que o embrião seja passado em diferentes soluções. É realizada a transferência directa do embrião da palhina em que foi vitrificado para o útero da receptora (Carnevale et al., 2006). A vitrificação de mórulas e blástocistos iniciais produz taxas de gestação similares às obtidas na transferência de embriões não criopreservados (Alvarenga et al., 2009). Sendo assim, devido às altas taxas de sucesso, como também à rapidez, praticabilidade e baixo custo, a vitrificação com transferência directa de embriões tornou-se uma metodologia altamente aplicável à reprodução equina (Alvarenga et al., 2009, Mckinnon & Squires, 2007).

3.3.4.2.1.2. Superovulação

A indução de múltiplas ovulações em éguas pode ser usada como um método para se aumentar a recuperação embrionária, possibilitando a recolha de vários embriões num só ciclo e, consequentemente: (1) diminuir os custos da TE (Blanchard et al., 2003; Mckinnon & Squires, 2007; Alvarenga et al., 2009); (2) aumentar o número de embriões disponíveis para congelação e o número de folículos pré-ovulatórios passíveis de recolha, aumentando o número de oócitos maturados *in vivo* (Mckinnon & Squires, 2007; Squires & McCue, 2007); (3) aumentar as taxas de gestação por recolha de embrião, de éguas inseminadas com sémen congelado (Mckinnon & Squires, 2007; Squires & McCue, 2007; Alvarenga et al., 2009); (4) aumentar a taxa de gestação de éguas cobertas com garanhões de baixa fertilidade (Mckinnon & Squires, 2007; Alvarenga et al., 2009); (5) melhoramento da fertilidade em éguas subférteis e (6) avanço da ovulação (Squires & McCue, 2007). Esta técnica não só é útil na TE como também na OT e na GIFT.

Porém, esta técnica, apresenta algumas limitações na espécie equina como a variabilidade do número de éguas que respondem ao tratamento de superovulação, a escassa disponibilidade comercial dos fármacos necessários ao tratamento, os custos elevados e a possível diminuição da viabilidade dos embriões produzidos desta forma (Mckinnon & Squires, 2007).

Nas espécies bovina, ovina e outras espécies silvestres, o tratamento com eCG, inicialmente conhecida por gonadotrofina do soro de égua gestante, ou com hormona folículo-estimulante (FSH) induz consistentemente a ovulação múltipla e tem aumentado a eficiência da TE (Blanchard et al., 2003; Mckinnon & Squires, 2007; Rocha, 2010). No entanto, a espécie equina é extremamente refractária ao tratamento com eCG (Mckinnon & Squires, 2007) e, em oposição ao que acontece nos ruminantes, só se consegue obter um embrião por lavagem já que as hormonas utilizadas para estimular a foliculogénese resultam no aumento do número de folículos com mais de 35 mm, mas tendem a dar resultados pouco satisfatórios no que diz respeito ao aumento do número de gestações por recolha (Rocha, 2010).

Desta forma, o Extracto de Pituitária Equina (EPE) e, mais recentemente, o FSH equino purificado, são os preparados indicados para se induzir a superovulação na fêmea equina (Squires & McCue, 2007; Alvarenga et al., 2009). As técnicas para aumentar a taxa de ovulação (Superovulação) na égua são geralmente mal sucedidas. Há uma variação individual enorme na resposta ao tratamento com FSHe. Éguas normais, jovens que apresentam ciclo éstrico com intervalos regulares respondem consistentemente ao FSHe, enquanto que éguas mais velhas têm uma resposta muito mais variável (Squires & McCue, 2007). Squires & McCue (2007) destacam um estudo

de Briant et al., (2004) em que a sensibilidade individual da égua à dose de FSHe injectado pode ser outro factor para a variabilidade da resposta ao tratamento com FSHe.

Squires & McCue (2007) sugerem como melhorar a resposta ao FSHe: (1) selecção de éguas com o número adequado de folículos e não iniciar o tratamento de éguas que já têm um folículo ovariano; (2) o uso de progesterona e estradiol para suprimir a população folicular antes do tratamento e no início de uma nova onda folicular; (3) talvez a interrupção do tratamento FSHe antecipadamente (30-32mm folículo) para evitar luteinização de folículos; e (4) diminuir a dose em éguas que têm demonstrado ser extremamente sensíveis a FSHe.

Muitas investigações têm sido realizadas com o objectivo de aumentar a taxa de ovulação. Contudo, continua a ser uma técnica dispendiosa, é muitas vezes um insucesso, resulta geralmente, em apenas um embrião extra (Alvarenga et al., 2009; GVEH) e devido às restrições das associações do número de poldros que podem ser registados por TE por égua por ano, não há incentivo para o desenvolvimento de métodos para superovular as éguas comparativamente ao que ocorre nas outras espécies (Blanchard et al., 2003; Hinrichs, 2005).

3.3.4.2.2. Técnicas com pouca aplicabilidade na prática clínica em Portugal

Tecnologias baseadas em processos *in vitro* e *in vivo* na produção de embriões têm aparecido, mas as taxas de sucesso em equinos ainda estão longe de permitir a sua utilização em protocolos de rotina.

A injeção intracitoplasmática de espermatozóides (Intracytoplasmatic Sperm Injection - ICSI) é uma das técnicas promissoras aplicáveis à indústria do cavalo (Landim-Alvarenga et al., 2008), estando a aproximar-se do nível de eficiência necessária para uso na produção clínica de poldros (Hinrichs & Young-Ho Choi, 2005). Técnicas de inseminação no oviducto e outras que permitem a inseminação com baixas doses de sémen (ICSI, GIFT e a Sexagem de gâmetas) estão em estudo, mas estas técnicas tem aplicação prática limitada em inseminações artificiais de rotina (Lopes da Costa et al., 2007). As técnicas restantes, *in vitro* e transferência nuclear (Nuclear Transfer – NT) são possíveis ao abrigo de condições de investigação, mas na prática clínica são ineficientes; estão actualmente em curso trabalhos para aperfeiçoá-las e melhorá-las para uso clínico (Hinrichs K. et al., 2005).

Os procedimentos de reprodução assistida têm limitações e riscos potenciais com os quais o Médico Veterinário deve estar familiarizado. O objectivo deste sub-capítulo é rever os actuais usos clínicos e as potenciais complicações.

3.3.4.2.2.1. Fertilização *in vitro*

Como alternativa à recolha de embriões de animais dadores, foram desenvolvidos recentemente métodos para a produção de embriões *in vitro*. Oócitos imaturos podem ser obtidos a partir de ovários de fêmeas inférteis ou idosas. Óvum “pick up” é uma técnica não-cirúrgica que utiliza ultrasonografia e uma agulha guiada para aspirar oócitos imaturos de ovários (Nacional Institute of Food and Agriculture – NIFA, EUA). Uma vez retirados do ovário, os óvulos imaturos são maturados, fecundados (NIFA), com espermatozóides capacitados em laboratório, (GVEH; Hafez & Hafez, 2004) e cultivados *in vitro*, até que se desenvolva a um estágio adequado para a sua transferência ou congelamento (NIFA).

A aceitação desta técnica é já comum nos seres humanos e, mais recentemente, nos bovinos (Hinrichs, 2007; GVEH). Nos cavalos, este procedimento só foi bem sucedido duas vezes em França, apesar do grande financiamento e do tempo investido pela comunidade científica. O seu sucesso depende de uma série de factores: a disponibilidade de oócitos imaturos saudáveis, métodos eficientes e repetitivos para maturação *in vitro*, capacitação fisiológica de sémen e subsequentemente bons sistemas de cultura de embriões *in vitro* (Landim-Alvarenga et al., 2008). No futuro, espera-se que esta técnica possa tornar-se mais disponível comercialmente para o cavalo (GVEH) e que as taxas de sucesso em equinos permitam a sua utilização em protocolos de rotina, como em bovinos (Landim-Alvarenga et al., 2008).

Porque a fertilização *in vitro* não foi bem sucedida por várias vezes no cavalo (Landim-Alvarenga et al., 2008), a fertilização *in vivo*, como a transferência intra-falópia de gâmetas (Gamete Intrafallopian Transfer - GIFT) e a ICSI têm sido desenvolvidas como métodos para utilizar um reduzido número de espermatozóides (Carnavale, 2008).

3.3.4.2.2.2. Fertilização *in vivo*

Na fertilização *in vivo*, a maturação do gâmeta ocorre *in vivo*, minimizando possíveis efeitos deletérios da maturação *in vitro*. Os oócitos são recolhidos de folículos pré-ovulatórios (≥ 35 mm de diâmetro) 24 a 36 horas após a administração de hCG à doadora ou entre 0 e 14 horas antes do momento da ovulação, quando já há relaxamento do tônus uterino e cervical e quando da presença de edema e comportamento de cio há 2 dias (Carnavale, 2007).

A Fertilização *in vivo* tem duas componentes:

1) Transferência de oócitos (Oocyte Transfer – OT):

Consiste na recolha de oócitos por aspiração de folículos maduros de uma égua dadora e posteriormente, o oócito é cirurgicamente transferido para o oviduto de uma égua receptora previamente inseminada normalmente por via transcervical ou por monta, para que a fertilização do óvulo ocorra no seu oviduto.

Esta técnica tem sido usada para obter gestações de éguas com histórico de falhas ovulatórias repetidas (GVEH). A incidência de falha na ovulação é relativamente elevada na égua e são mais frequentes em éguas velhas que em jovens (Carnevale, 2008), que não conseguem ovular ou ovulam mas o oócito não entra no oviduto (Carnevale, 2007). Neste procedimento, como o óvulo é removido do folículo por aspiração, a falha na ovulação não poderá impedir o sucesso de uma gestação. No entanto, se uma égua não ovular por causa de um oócito de má qualidade, a transferência de oócitos não irá resultar numa prole viável (Carnevale, 2008).

A patologia uterina é a causa mais comum de falha de fertilidade na égua. Úteros susceptíveis a inflamações uterinas (Carnevale, 2008), alterações degenerativas persistentes ou recorrentes no útero e cérvix (Coutinho da Silva, 2008) e infecções uterinas crónicas (Coutinho da Silva, 2008), como endometrites e piómetras (Hinrichs & Young-Ho Choi, 2005) são uma razão comum para o encaminhamento das éguas para OT. Em contrapartida, algumas éguas aparentemente com ovulação normal e sem patologia uterina, não conseguem engravidar ou gerar um embrião viável. Potencialmente, essas éguas têm problemas oviductais (Carnevale, 2008) e são igualmente encaminhadas para OT.

2) Transferência de gâmetas intrafalópica (GIFT):

Este procedimento assemelha-se em muito à transferência de oócitos mas a deposição dos espermatozóides em pequeno número é realizada, juntamente com o oócito, no oviduto da receptora, caracterizando a transferência intrafalópica de gâmetas. Esta técnica é ideal quando se quer reduzir ao mínimo o número de espermatozóides usados, por exemplo quando se está perante garanhões subférteis, e em caso de sémen congelado ou sémen sexado (Carnevale, 2007). Actualmente, GIFT comparativamente à ICSI tem uso clínico limitado. Os procedimentos para GIFT podem ter de ser modificados de acordo com a individualidade de cada garanhão (Carnevale, 2008).

Com isso a fertilização, o desenvolvimento embrionário e o desenvolvimento fetal, na OT e na GIFT ocorrem integralmente na égua receptora. Nestes procedimentos deve-se ter o maior dos cuidados para assegurar que os oócitos da receptora não sejam

fertilizados, removendo-os, ou em alternativa usar éguas não cíclicas ou com actividade folicular reduzida (Carnevale, 2007).

As taxas de sucesso destas técnicas são bastante baixas aproximadamente 30%, mas é uma alternativa para gerar descendentes de éguas incapazes de produzir embriões (GVEH). Apesar das técnicas de reprodução assistida ajudarem a ultrapassar vários problemas reprodutivos e na produção de poldros de éguas mais velhas, defeitos intrínsecos de oócitos induzidos pelo envelhecimento materno não deverão ser ignorados (Carnevale, 2008). O custo de OT e da GIFT são normalmente superiores à transferência de embriões. No entanto, para éguas com dificuldade em doar embriões, o custo adicional por ciclo pode ser compensada por uma maior taxa de sucesso por ciclo com a OT (Carnevale, 2008).

3.3.4.2.2.3. Fertilização Assistida – Injecção intracitoplasmática de sémen (ICSI)

O procedimento é semelhante à transferência de gâmetas intrafalópio em que o óvulo é removido da égua doadora próximo do momento da ovulação (Hafez & Hafez, 2004b). Em seguida, realizado com instrumentos muito delicados, é injectado um único espermatozóide no interior do óvulo através de uma pipeta de vidro pequena (Hafez & Hafez, 2004b; Mckinnon, Trounson & Silber, 2007). O oócito injectado pode ser cultivado *in vitro* ou logo transferido para a receptora (Mckinnon et al., 2007; Coutinho da Silva, 2008). Esta técnica é aplicada em diferentes tipos de infertilidade feminina e masculina (Hafez & Hafez, 2004b).

Actualmente, a ICSI é o principal método utilizado para produzir poldros de garanhões com infertilidade ou problemas de disponibilidade de esperma (Squires, 2005; Carnevale, 2008), por exemplo garanhões com espermatozóides de má qualidade (Carnevale, 2008), garanhões velhos e subférteis, com número reduzido de espermatozóides (Carnevale, 2008; Coutinho da Silva, 2008; Squires, 2009), para gerar gestações quando há quantidades limitadas de sémen congelado ou através de espermatozóides do epidídimo congelado após a morte de um garanhão (Hinrichs & Young-Ho Choi, 2005; Carnevale, 2008; Squires, 2009).

Injecções de esperma requerem equipamento especial e perícia, o que provavelmente limita a utilização generalizada de ICSI (Carnevale, 2008; Coutinho da Silva, 2008). O custo e as baixas taxas de recolha e maturação de oócitos (Coutinho da Silva, 2008) são outras limitantes. Por enquanto esta técnica apenas tem sido utilizada por vários laboratórios para produzir embriões *in vitro* (Squires, 2005).

3.3.4.2.2.4. Transferência Nuclear (NT) ou Clonagem

A NT consiste em transferir por microinjecção o núcleo de um blastómero ou de células somáticas (pele, coração, nervos, ou outro órgão) para um óvulo não fertilizado enucleado. Este processo é também conhecido como clonagem (NIFA). Depois da cultura e desenvolvimento *in vitro*, os embriões são transferidos para uma fêmea receptora e, finalmente, podem resultar no nascimento de proles vivas (Hinrichs & Young-Ho Choi, 2005).

A taxa de sucesso da multiplicação de animais por NT é frequentemente inferior a 10% e depende de muitos factores, incluindo a espécie, a origem dos óvulos destinatários, o tipo de célula que doou os núcleos, o tratamento das células das dadoras antes da transferência nuclear, as técnicas utilizadas na transferência nuclear, etc. (NIFA).

Ao tornar possível a criação de um grande número de indivíduos idênticos, a clonagem de embriões têm potencial para resgatar genética equina importante (ex: campeões desportivos) (Allen, 2005) e para comparar as influências do ambiente (intra e extra-uterina) e mudanças epigenéticas (alterações na expressão de genes, ou a expressão anormal de genes induzidos pela reprogramação incompleta da cromatina da célula doadora) criando enormes variabilidades no fenótipo dos descendentes clonados (Hinrichs & Young-Ho Choi, 2005). Também a investigação de uma afecção com forte predisposição hereditária pode ser estudada com muito menos animais se se usarem gémeos ou animais idênticos (Landim-Alvarenga et al., 2008; GVEH).

A título de curiosidade, a clonagem é oferecida por um número limitado de empresas nos Estados Unidos e na Europa que estão disponíveis para receber as biópsias da pele e preparar e armazenar os fibroblastos para uso futuro. A empresa fornece ao veterinário um kit para a obtenção e transporte da biópsia da pele para o laboratório. O cultivo das células da pele, o seu congelamento e armazenamento são realizados a um custo razoável que garante que a genética de reprodutores importantes não seja perdida, sendo uma mais valia para proprietários que enfrentam a morte accidental ou infertilidade de um animal valioso.

3.3.4.2.2.5. Sexagem de sémen ou embriões.

A capacidade para sexar sémen e embriões tem um grande potencial de comercialização (Hafez & Hafez, 2004b). A sexagem de sémen oferece potencial para aumentar o número de descendentes do mesmo sexo numa população fechada (Nicholas, 1996).

Extensas investigações têm sido realizadas no sentido de pré-seleccionar e conseguir a separação dos espermatozóides X ou Y antes da IA (Hafez & Hafez, 2004b). A

separação dos espermatozóides baseia-se nas muitas diferenças potenciais existentes entre os espermatozóides X e Y. A presença de um cromossoma X ou Y pode causar uma diferença no tamanho e forma do espermatozóide, no peso, na densidade, na mobilidade, na carga superficial, na bioquímica superficial e na bioquímica interna (Hafez & Hafez, 2004b).

Nas várias espécies pecuárias o objectivo da sexagem é a obtenção de fêmeas e machos para reposição de rebanhos em explorações de produção de leite e carne respectivamente. Em equinos, a sexagem de sémen e embriões antes da implantação pode contribuir não só para a eficiência económica, fornecendo mais descendência para venda, mas também para a reposição de éguas reprodutoras (Hafez & Hafez, 2004) optimizando o manejo reprodutivo em programas de selecção. Factores que limitam o uso de gâmetas sexados na indústria do cavalo são o custo do equipamento, e a logística complexa de ter a égua, o cavalo e o equipamento numa mesma região (Squires, 2005).

3.4. Repercussões na Produtividade

Ao contrário de outras espécies domésticas, os equinos foram seleccionados pelas suas características morfológicas e pelas suas prestações em actividades desportivas. Características como a fertilidade foram descuradas, sendo a taxa de concepção nos cavalos, a mais baixa de todas as espécies domésticas (Merkt et al., 1979, retirado de Valera, Esteves & Molina, 2000). Uma eficiência reprodutiva baixa dificulta a viabilidade económica de muitas coudelarias.

A produção equina é um investimento de longo prazo, pois é necessário um longo período antes que haja retorno do investimento (Bosh et al., 2009a). Melhorar a nossa compreensão da égua, do cavalo, identificar e avaliar o significado dos factores que podem influenciar a fertilidade (Buiten, Westers & Colenbrander, 2003) e dos factores de manejo que afectam a probabilidade de produzir um poldro vivo (Bosh et al., 2009a) são pré-requisitos (Buiten et al., 2003) que vieram contribuir enormemente para a eficiência global da reprodução (Morris & Allen, 2002) e são fundamentais para garantir um retorno financeiro positivo (Bosh et al., 2009a).

A razão pela qual pouco se sabe sobre as repercussões económicas na espécie equina é porque a produção dos animais é frequentemente um hobby ou porque o proprietário, devido ao valor sentimental, adquire animais com os quais obteve bons resultados em competições durante um período prolongado e não por razões como o lucro. No entanto, mesmo aqueles que não tem objectivos de carácter económico querem geralmente minimizar as despesas que a criação cavalar lhes acarreta (Morris & Allen, 2002).

Em todas as coudelarias, a estratégia para aumentar o retorno económico é aumentar a taxa de gestação do efectivo e o número de poldros produzidos por égua. Para isso é vital o trabalho de equipa e um compromisso em termos de interesse e investimento por parte do proprietário. Em termos de interesse, de tempo pessoal e instalações por parte do gestor da coudelaria e em termos de interesse, tempo, conhecimento, especialização, experiência e fornecimento do material necessário por parte do Médico Veterinário (Bosh et al., 2009a).

Desde a década de 80 que Portugal abriu as portas do estrangeiro ao cavalo lusitano, fazendo com que o apoio e o investimento nesta raça aumentassem. Muitas manipulações de espermatozóides na IA, de gâmetas em várias tecnologias de reprodução assistida, e de embriões na TE passaram a ser utilizados em programas de melhoramento animal (Foote, 2003). Estimativas precisas da eficiência reprodutiva destes procedimentos são importantes. Basicamente, a eficiência reprodutiva das tecnologias de reprodução assistida poderá repercutir-se em 4 pontos principais:

diminuição do número de cobrições/inseminações; diminuição dos intervalos entre partos; aumento do número de poldros produzidos; e no melhoramento genético.

3.4.1.Repercussões na diminuição do número de cobrições ou inseminações

O número de éguas com problemas e/ou patologias reprodutivas que retornaram à ciclicidade/fertilidade, a precisão com que o momento da ovulação pode agora ser estimado e o rígido controle da quantidade e da qualidade do esperma são aspectos em que a aplicação de novas tecnologias veio trazer benefícios evidentes, aumentando a probabilidade de concepção e diminuindo o número de cobrições ou inseminações necessárias para garantir a gestação. Esta diminuição do número de cobrições/inseminações, irá possibilitar:

- Redução dos custos de manejo, das despesas veterinárias, do transporte, tanto dos animais como do sémen, nas situações requeridas. Através da diminuição da necessidade de voltar a sincronizar o estro da égua e de induzir a ovulação, que exigem mais mão-de-obra e mais despesas veterinárias. Igualmente, veio diminuir a necessidade de voltar a usar o garanhão, deixando-o disponível para um maior número de éguas e/ou produzir um novo lote de sémen, quando aplicável. Assim, minimizar o número de vezes que a égua é coberta/inseminada ou o número de vezes que é usado sémen do garanhão durante a estação, maximiza a eficiência ao longo do tempo, em termos de recuperação do investimento.
- Diminuição dos riscos para a égua, garanhão, operador, veterinários e todo o pessoal envolvido. Diminui riscos físicos, psicológicos, transmissão de doenças, etc.
- Aumento da eficiência reprodutiva na fêmea. A diminuição do número de cobrições diminui os riscos de transmissão de doenças venéreas, de infecções e diminui a resposta inflamatória das éguas ao sémen. Bosh et al. (2009b), em conclusão afirma, que éguas cobertas várias vezes durante a época reprodutiva têm menores probabilidades de produzir um poldro vivo e que múltiplas cobrições têm um impacto profundo na fecundidade da égua ao longo do tempo. O aumento do número de cobrições diminui as probabilidades de fecundação, aumenta a probabilidade de perdas de gestação e de abortos (Morris & Allen, 2002). Assim, a diminuição do número de cobrições favorece positivamente a eficiência reprodutiva da égua.

- Aumento da eficiência reprodutiva no garanhão. Com menos cobrições obtêm-se maior número de ejaculados ricos em espermatozóides e maior disponibilidade reprodutiva do garanhão em cobrir maior número de éguas. A rentabilização de sémen, em particular sémen congelado de garanhões falecidos ou incapacitados.

O número de cobrições/inseminações por gestação com a introdução destas técnicas passou de 7 a 8 saltos por poldro nascido na cobrição natural para 1 a 3 saltos/inseminações por poldro nascido quando as éguas são acompanhadas (Duarte, 2010, comunicação pessoal).

3.4.2. Repercussões na diminuição do intervalo entre partos

A elevada proporção de éguas com flutuações nas suas datas de parto entre sucessivas épocas reprodutivas tem um impacto na produtividade ao longo do tempo. As flutuações das datas de parto devem-se à cobrição das éguas várias vezes durante a época reprodutiva, devido a falhas e consequente demora em estabelecer a gestação, na égua no pós-parto (Bosh et al., 2009a). Várias cobrições são um indicador de redução da fertilidade na égua, garanhão, ou ambos (Bosh et al., 2009b). Para evitar a flutuação nas datas de parto, as éguas devem ser cobertas dentro de aproximadamente 25 dias pós parto (Loy, 1980, citado por Bosh et al., 2009a). É importante que as éguas paridas sejam cuidadosa e adequadamente manipuladas para conseguir que entrem em gestação neste espaço de tempo, pois a perda de produtividade ao longo do tempo terá certamente impacto na rentabilidade (Bosh et al., 2009a).

As novas técnicas de reprodução assistida, como a ultrasonografia para reconhecimento do estado reprodutivo da égua, o controlo do ciclo éstrico através da regulação hormonal, a melhoria na qualidade do sémen através do aumento da taxa de concepção e a aplicação da IA e TE tornaram possível o retorno da égua ao cio e posterior concepção num intervalo de tempo mais curto, diminuindo o intervalo entre partos.

A diminuição do intervalo entre partos veio trazer a esta indústria a possibilidade de:

- Aumentar as taxas de concepção, conduzindo à produção de um maior número de poldros por égua. Um parto ocorrido antes de 1 de Abril tem maior chance de produzir um poldro no ano subsequente (Bosh et al., 2009a). Se durante anos sucessivos, a égua parir mais tarde, eventualmente terá de renunciar a uma época de cobrição (Bosh et al., 2009b).

- Obter nascimentos de poldros o mais próximo do início do ano. Os preços de venda de poldros jovens com datas de parto tardias são muitas vezes inferiores aos de poldros nascidos nos primeiros meses da época de parição (Bosh et al., 2009a). A eventual venda abaixo do preço de custo, na situação limite de dificuldade de escoamento dos animais, passa a representar uma imobilização de capital com perda de valor (Almeida).

A evolução/melhoria do intervalo entre partos com a introdução destas técnicas passou de 20 a 24 meses (às vezes até mais) para 15 a 17 meses, nalguns casos apenas 12 meses quando cobertas no cio do poldro (Duarte, 2010, comunicação pessoal).

3.4.3. Repercussões no aumento do número de poldros produzidos

Morris & Allen (2002), num estudo realizado sobre a eficiência reprodutiva do maneio intensivo em éguas do Reino Unido, afirmam que, apesar das taxas de perda de gestação precoce, a proporção global de éguas que produziu um poldro vivo aumentou de 74,7% para 82,8% nos últimos 15 anos quando um estudo semelhante foi realizado e, paralelamente, por um aumento similar na taxa de parto em éguas de 71,4 para 79,2%.

A evolução do controlo reprodutivo nos últimos anos, ao aumentar o número de poldros vivos, contribuiu para:

- Melhor gestão do efectivo. Ao aumentar as taxas de concepção, um menor número de éguas serão necessárias para produzir um mesmo número total de poldros, ou seja, obter as taxas de concepção desejadas. Em contrapartida, quanto maior o número de poldros de topo obtidos, maior a chance de escoamento desses animais.
- O aumento do capital financeiro da exploração. Em primeira instância, apercebemo-nos que se o número de poldros aumenta os gastos aumentam. Bosh et al. (2009a) dividem os custos de produção de um poldro nos EUA em várias categorias: 1) custo de manutenção diário da égua; 2) custos de substituição da égua e custos em seguros; 3) custos associados à sua actividade reprodutiva (ou seja, veterinários, transporte, etc.); 4) custos de saúde de rotina e custos do ferrador. Conclui assim que a receita gerada a partir do poldro é necessária para recuperar custos de produção e investimento. O pequeno aumento nos custos adicionais associados com a cópula e gestação da égua é geralmente fortemente compensado pelas

receitas de vendas futuras dos descendentes, principalmente quanto maior for o valor da égua, permitindo retorno financeiro e lucro.

O número de poldros produzidos ao longo da vida reprodutiva duma égua (entre os 4 e os 16 anos de idade, ou seja ± 12 anos) era de 3 a 5 e, com a introdução destas técnicas, passou para 9 a 11 poldros. (Duarte, 2010, comunicação pessoal).

3.4.4. Repercussões do melhoramento genético

Ao banir da reprodução animais de baixo valor zootécnico e ao permitir que éguas e garanhões de alto valor zootécnico aumentem a sua eficiência reprodutiva, a reprodução assistida veio aumentar o número de poldros geneticamente superiores. A aposta em partos direccionados aos melhores animais irá traduzir-se num aumento da pressão de selecção e consequente resposta à selecção, num direccionamento do investimento para a qualidade (Almeida, a), ou seja, uma aceleração do melhoramento genético. Num ambiente em que frequentemente se relega a vertente económica da criação do cavalo para segundo plano, é importante haver uma interiorização de que a criação tem de passar a estar atenta às leis do mercado da oferta e da procura (Almeida, a). Esta última é garantida pela qualidade e utilidade dos nossos cavalos, que é conseguida através do melhoramento genético da raça. O melhoramento genético permite a obtenção de indivíduos com características desejáveis, a partir do conhecimento do controlo genético dessas características e da sua variabilidade. Basicamente, oferece fiabilidade do potencial genético do reprodutor em questão, no que respeita à transmissibilidade do melhoramento pretendido, e aumentando a perspectiva de retorno do investimento envolvido (Almeida, 2005a).

Uma vez que a eficiência reprodutiva está intimamente ligada à rentabilidade (Bosh et al., 2009), a diminuição do número de cobrições/inseminações, a diminuição do intervalo entre partos, o aumento do número de poldros vivos e o melhoramento genético, podem certamente ter um papel impulsionador para ajudar as explorações a modificar as práticas de manejo e de gestão das novas tecnologias aplicadas à reprodução. O conjunto das actividades produtivas que estas mudanças no modo como se cria podem originar é extenso, desde a criação especializada, até às indústrias auxiliares relacionadas directamente com o mundo equestre, como determinadas produções agrícolas (palha, cevada, forragens, etc.) ou determinadas empresas de transporte, o trabalho de tratadores, ferradores e outros profissionais que trabalham com cavalos, sem esquecer o ensino de cavalos e cavaleiros. Mas também noutros sectores económicos, como fábricas de roupa, companhias de seguros, hotéis

e restaurantes, que têm uma relação indirecta com a despesa realizada em muitas destas actividades desenvolvidas no sector. Quando a resposta das empresas é positiva, incrementa-se a produção, o emprego, o desenvolvimento rural e a riqueza (Castejon, 2005).

Castejon (2005), num artigo sobre a importância do sector equestre, conclui dizendo que melhorar a criação, conjuntamente com as entidades competentes, dotando-a de serviços complementares para que as actividades equestres procuradas se possam realizar é a base para um Plano Estratégico que torna possível a contribuição do sector equestre para o desenvolvimento económico de um país. Para isso é necessário: (1) juntar os esforços de todos os implicados na indústria do cavalo, tanto a nível nacional como regional e local; (2) incrementar a participação dos aficionados do cavalo e desenvolver o contributo social da Indústria do Cavalo; (3) apoiar os resultados económicos das empresas do sector equestre; (4) aumentar as competências equestres da população, o treino e nível de qualidade; (5) incrementar o acesso a cavalos e charretes em caminhos rurais; (6) considerar o impacto do cavalo no ambiente; (7) estimular a excelência no desporto equestre; (8) melhorar a qualidade de criação de cavalos e pôneis.

O aumento da eficiência reprodutiva, aliada ao melhoramento genético, oferecida pelas novas práticas de criação, vem ainda conferir a Portugal a possibilidade de lançamento da raça Lusitana fora do País. Embora Portugal ainda seja um país com pequeno grau de desenvolvimento comercial em relação ao resto do mundo, a exportação, irá aumentar pelo menos o leque de opções de venda de cavalos e ou sémen, já que a produção de embriões ainda está muito limitada em Portugal.

A internacionalização leva ao desenvolvimento da empresa, pois obriga-a a modernizar-se, seja para conquistar novos mercados, seja para preservar as suas posições no mercado interno. Consequentemente, a melhoria da qualidade do produto também tende a aumentar, pois a empresa tem que adaptá-lo às exigências do mercado ao qual se destina, o que a obriga a aperfeiçoar o produto. Os gastos das explorações, ao modernizarem a assistência à reprodução através da implementação de técnicas como a Inseminação Artificial e a Transferência de Embriões aumenta, e por isso a sua aplicação irá ser favorecida na maioria das vezes em animais com alto valor genético para serem comercializados de forma agressiva, diminuindo a venda no mercado de éguas e garanhões de baixa e média qualidade. As Técnicas de Reprodução Assistida impõe uma melhor gestão de éguas e garanhões, que vai favorecer o melhoramento genético da raça, ou seja, a melhoria do produto.

Do mesmo modo, os proprietários das explorações ao ingressarem no mercado internacional é-lhes exigido normas e procedimentos que, com o tempo, são interiorizadas e passam a ser rotineiras e, assim, todos os seus negócios posteriores

com o exterior, ou com o mercado interno serão feitos dentro destes parâmetros. O papel da certificação é uma forma de adequação contínua, auto-controlo e de oferta de garantias a quem compra, (Almeida, 2005b). Quando uma empresa começa a exportar, a produção aumenta numérica e qualitativamente. Naturalmente, aumenta também a capacidade de negociação para a compra de matérias-primas e serviços vários, como o serviço veterinário. Com isso, os custos tendem a diminuir, tornando as explorações mais competitivas e aumentando a margem de lucro. Igualmente, ao ampliar a sua carteira de clientes, o proprietário corre menos riscos, pois, quanto maior o número de mercados ela atingir, menos dependente ela será. A diversificação de mercado permite, ainda, que a sazonalidade do produto seja eliminada, isto é, por exemplo, uma exploração que investe na exportação de sêmen refrigerado do seu garanhão (visto este ter melhor qualidade e de nem todo o sêmen dos garanhões responderem bem à congelação), poderá fazê-lo o ano inteiro, porque terá diferentes mercados onde vendê-los e não dependerá somente das estações do País. O mesmo se aplica ao mercado de exportação de embriões congelados, onde podem ser recolhidos embriões de dadoras, congelados e vendidos para fora do País em alturas fora da época de reprodução nacional. Neste sentido, o comércio exterior adquire cada vez mais importância para o proprietário da exploração que queira realmente crescer, pois vai aumentar o retorno económico da coudelaria, assim como para a economia portuguesa, mediante a geração de emprego e de lucro interno. Ao estimular a produção nacional, as exportações geram empregos directos neste sector, com especial ênfase para o Médico Veterinário. A aplicação destas técnicas exige que os médicos veterinários que trabalham em centros de IA de equinos sejam especializados em reprodução equina e, por conseguinte, possuam um elevado nível técnico compatível com uma prestação de serviços veterinários ao mais alto nível.

3.5. Casos Clínicos

Este capítulo tem como objectivo a descrição de casos clínicos que acompanhei ao longo do Estágio. São casos exemplificativos da importância que a adopção de novas práticas de manejo no controlo reprodutivo e a incorporação das tecnologias da reprodução assistida têm na produtividade equina.

3.5.1. Égua 1

Égua de nove anos, de raça Lusitana, não ficou gestante na época reprodutiva anterior, ou seja, não pariu nenhum poldro no último ano. O dono pretendia que no corrente ano a égua fosse inseminada com sémen fresco do garanhão X. O garanhão encontrava-se no centro a dar sémen para congelar. Desde o início da época reprodutiva de 2010, a égua ainda não tinha mostrado sinais de cio. Foi estimulada várias vezes em campo com hCG, não tendo surtido efeito.

Dia 1 – Início acompanhamento reprodutivo pelo Médico Veterinário. Exame reprodutivo não mostrou nada de significativo tanto no ovário esquerdo como no direito. Estes apresentavam-se pequenos à ecografia e o útero apresentava edema fisiológico médio para uma égua em cio. Fora-lhe administrado 4cc de GnRH.

A esta égua já tinha sido induzida a ovulação com hCG, mas sem resultados. O problema deste método é o hCG ser uma grande molécula glicoprotéica, que induz uma acção antigénica muito exacerbada por parte do sistema imunológico quando utilizada mais do que duas, três vezes na mesma estação reprodutiva. Foi assim, induzida nova ovulação agora com GnRH, que é menos antigénica, reduzindo a possibilidade de criação de anticorpos.

Dia 6 – Observações: Ecografia – dois folículos de 25mm no ovário direito.

Dia 8 – Observações: Ecografia – um folículo dominante de 34mm no ovário direito e o útero com edema fisiológico bastante pronunciado com alguma quantidade de líquido. Acções: Lavagem uterina e administração de 20cc de ceftiofur.

Depois de lavado, como o líquido apresentava alguma turvação, suspeitando-se que fosse líquido infeccioso, foi administrado conjuntamente com o último litro da lavagem o ceftiofur (princípio activo do produto comercial, Excenell®) por via intra-uterina, três dias seguidos. O ceftiofur é um antibiótico de largo espectro de acção, pertencente ao grupo das cefalosporinas, usado no tratamento de infecções bacterianas associadas a *Streptococcus*

zooeptidemicus, *Streptococcus equi*, *Pasteurella* spp, *Staphylococcus* spp e *Escherichia coli*.

Dia 9 – Observações: Ecografia – o resultado da medição do ovário direito à ecografia era de 40mm e o útero permanecia com edema fisiológico bastante marcado. Acções: administração de 2cc de ocitocina e 1cc de acetato de deslorelina com o intuito de promover a contracção uterina de modo a eliminar o líquido do útero antes de se inseminar a égua e para induzir a ovulação, respectivamente. O acetato de deslorelina é um péptido com menor peso molecular do que as GnRHs e é assim menos antigénico, reduzindo a possibilidade da criação de anticorpos por administrações sucessivas durante a estação reprodutiva.

Dia 9 à tarde – Acções: inseminação com sémen fresco do garanhão X.

Dia 10 – Observações: Ecografia – égua não ovulada; folículo no ovário direito com 42mm e o útero permanece com líquido. Acções: lavagem intra-uterina com lactato de Ringer e administração de 20cc de ceftiofur.

Usou-se 4L de lactato de Ringer até o líquido de limpeza sair límpido, sem qualquer turvação e no último litro da lavagem adicionou-se pela última vez ceftiofur.

Dia 10 ao fim do dia – Observações: Ecografia – sem sinais de ovulação, o útero com menos líquido. Acções: reinseminação com 20cc de sémen fresco diluído do garanhão X.

Dia 11 – Observações: Ecografia – égua ovulada e com pouco líquido no útero. Acções: lavagem com 1L de lactato de Ringer e administração de 2cc de ocitocina.

Dia 11 ao fim do dia – Acções: administração de 2cc de ocitocina, para eliminar o restante líquido que ficou no útero após lavagem.

Após inseminação verifica-se por norma uma forte reacção inflamatória e para garantir o sucesso da inseminação é fundamental aplicar o tratamento de fluidoterapia uterina, no mínimo 1L ou até o fluido sair límpido, com ou sem antibióticos, e acompanhada de injeção endovenosa de ocitocina, tratamento este que não deverá ultrapassar os primeiros 2 dias pós inseminação.

Dia 22 – Observações: Ecografia – diagnóstico de gestação positivo.

Na Tabela 1 estão esquematizados por ordem cronológica todas as intervenções e os resultados das observações realizadas à égua 1.

Data	Exame			Observações	Produtos
	OD	OE	Útero		
06/5	N.S.	N.S.	++	Ovários muito pequenos	4cc GnRH
11/5	2 Fol. 25mm	N.S.		Ver 5ª feira (daqui a 2 dias)	
13/5	1 Fol. dom. 34mm	N.S.	+++ Líquido	Lavada c/ 1L lactato de Ringer	20cc Ceftiofur (Excenell)
14/5	40mm	N.S.	+++	IA hoje e amanhã 20cc Ceftiofur (Excenell)	2cc Ocitocina 1cc Acetato de deslorelina
	40mm	N.S.	+++	IA com sémen do X	
15/5	42mm	N.S.	Líquido	4L lactato de Ringer + 20cc Ceftiofur (Excenell)	
	N/ ovulada	N.S.	Muito pouco líquido	Inseminada c/ 20cc de sémen fresco diluído as 24h15m	
16/5	Ovulada	N.S.	Pouco líquido	Lavada c/ 1L lactato de Ringer	2cc Ocitocina IV
					2cc Ocitocina
27/5				Diagnóstico gestação +	

Tabela 1 – Historial clínico da égua 1 no centro.

Legenda: OD e OE – ovário direito e esquerdo, respectivamente; N.S. – Não significativo; Fol.dom. – Folículo dominante; IA – Inseminação artificial; IV – intravenosa; (+), (++) , (+++) - diferentes graus de edema fisiológico, pouco, médio e elevado.

3.5.2. Égua 2

Égua de 8 anos, de raça Lusitana, utilizada na disciplina de obstáculos, acabou por perder interesse desportivo e o proprietário decidiu destiná-la à reprodução. O ano presente é o segundo em que é usada para reprodução, tendo parido um poldro o ano passado. É uma égua que recusa violentamente a monta natural ou controlada e portanto foi necessário submetê-la à reprodução assistida, tendo sido por isso contactado o Médico Veterinário. O dono desejava inseminar a égua com sémen fresco do garanhão Y.

Dia 1 – Início acompanhamento reprodutivo pelo Médico veterinário. Exame reprodutivo: égua com ausência de cio, égua em anestro; Ecografia – nada de significativo, ovários pequenos e o útero sem edema. Acções: administração de 2cc de dinoprost tromethamine (princípio activo do produto comercial Dinolytic®).

O dinoprost tromethamine é uma prostaglandina que para além de outras funções é usada para a sincronização do cio.

Dia 6 – Observações: Ecografia – ovário esquerdo multifolículo e o útero com edema ligeiro.

Dia 10 – Observações: Ecografia – ovário esquerdo com um folículo dominante de 40mm e o útero apresenta edema fisiológico médio. Acções: administração de 2cc de ocitocina, 2 pipetas de gonadotrofina coriónica (princípio activo do produto comercial Chorulom), para promover a contracção uterina de modo a limpar algum líquido que pudesse permanecer no útero e induzir a ovulação respectivamente. Inseminação programada para o dia seguinte.

A gonadotrofina coriónica do produto comercial chorulom assemelha-se à gonadotrofina coriónica humana do produto comercial Pregnyl. Ambos têm como objectivo a indução da ovulação, e ambos os produtos comerciais contém 3000 UI de hCG.

Dia 11 – Observações: Ecografia – ovário esquerdo mantém um folículo de 40mm e o útero o edema fisiológico médio.

Dia 11 à tarde – Acções: inseminação com sémen fresco do garanhão Y.

Dia 12 – Observações: Ecografia – égua ovulada, útero continha uma pequena quantidade de líquido. Acções: lavagem com 1L de lactato de Ringer conjuntamente com 30cc de sulfato de gentamicina (princípio activo do produto comercial Gentamicina), isto porque, em equinos, o sulfato de gentamicina apenas é aprovada para infusão intra-uterina; administração de 2cc de ocitocina para promover a contracção uterina de modo a expulsar o líquido presente no útero após a lavagem.

O sulfato de gentamicina é usado no tratamento de infecções sérias por gram-negativos quando é documentada falta de susceptibilidade a outros antibióticos menos tóxicos, ou quando a situação clínica exige tratamento imediato de uma presumida infecção por gram-negativos antes da cultura e dos resultados serem relatados. O sulfato de gentamicina foi administrado à égua devido à presença de líquido intra-uterino, mais uma vez pressupõe-se que seja um líquido infeccioso, resultado de uma reacção inflamatória causada pela deposição de sémen no útero.

Dia 13 – Observações: Ecografia – presença de um corpo lúteo. Acções: nova lavagem com 1L lactato de Ringer e administração de 2cc de ocitocina para eliminar o líquido remanescente.

Dia 14 – Acções: aplicação de 2cc de ocitocina para eliminar o excesso de sémen e o líquido inflamatório formado pós inseminação.

Dia 25 – Observações: Ecografia – o diagnóstico de gestação positivo.

Na Tabela 2 estão esquematizados por ordem cronológica todas as intervenções e os resultados das observações realizadas à égua 2.

Data	Exame			Observações	Produtos
	OD	OE	Útero		
24/4	N.S.	N.S.	Sem edema fisiológico	Ver 5ª feira (daqui a 5 dias)	2cc Dinoprost Tromethamine (Dinolytic)
28/4	N.S.	M.F.	+	Ver domingo. A iniciar cio	
03/5	N.S.	40mm.	++	IA amanhã	2cc Ocitocina 2 pipetas de Gonadotrofina Coriónica (Chorulon)
04/5	N.S.	40mm	++	IA com semen do Y	
05/5	N.S.	Ovulada	++	Líquido. Lavagem c/ 1L Ringer + 30cc Sulfato de Gentamicina (Gentamicina)	2cc Ocitocina
06/5	N.S.	Corpo Lúteo	++	1L lactato de Ringer	2cc Ocitocina
07/5	N.S.	Corpo Lúteo	+		2cc Ocitocina
11/5				Diagnóstico Gestação +	

Tabela 2 – Historial clínico da égua 2 no centro.

Legenda: OD e OE – ovário direito e esquerdo respectivamente; N.S. – Não de significativo; M.F. – multifolículo; Fol.dom. – Folículo dominante; IA – Inseminação artificial; (+), (++) , (+++) - diferentes graus de edema fisiológico, pouco, médio e elevado.

3.5.3. Égua 3

Égua de 9 anos de raça Lusitana. O dono pretendia inseminá-la com sémen congelado do garanhão W, que se encontrava no Reino Unido. Pouco se sabia do historial reprodutivo anterior da égua.

Dia 1 – Início controlo reprodutivo pelo Médico Veterinário. Exame reprodutivo: Ecografia – ovário direito e esquerdo com um folículo de 36mm de altura por 39mm de largura e 31mm de altura por 25mm de largura, respectivamente, o útero com edema fisiológico médio.

- Dia 2 – Observações: Ecografia – folículo do ovário direito com 41mm e o esquerdo multifolículo.
- Dia 3 às 8h00 da manhã – Observações: Ecografia – folículo no ovário direito com 43mm, dor à palpação do ovário direito e útero com edema fisiológico médio. Foram feitas mais duas ecografias até as 11:00 h da manhã para controlo do desenvolvimento folicular e ambas tiveram diagnóstico semelhante à primeira ecografia.
- Dia 3 ao 12:00h – Observações: Ecografia – égua ovulada; ovário esquerdo multifolículo e o útero com edema fisiológico médio. Acções: inseminação com sêmen congelado do garanhão W.
- Dia 4 – Observações: Ecografia – um corpo lúteo. Acções: lavagem com 1L lactato de Ringer e administração de 2cc de ocitocina para eliminar o restante líquido que permanece no útero após lavagem.
- Dia 17 – Observações: Ecografia – diagnóstico de gestação negativo; um novo folículo no ovário esquerdo de 30mm.
- Dia 18 – Observações: Ecografia – folículo do ovário esquerdo em crescimento, agora com 34mm e o útero com um aumento do edema fisiológico.
- Dia 19 à tarde – Observações: Ecografia – folículo já com 36,8mm, o útero constante. Acções: administração de 1cc de acetato de deslorelina para induzir a ovulação.
- Dia 20 – Observações: Ecografia – um folículo de 39mm e útero com edema fisiológico médio.
- Dia 21 de manhã – Observações: Ecografia – tamanho do folículo constante e o útero com edema fisiológico bastante acentuado. Acções: inseminação com sêmen do garanhão W, 9h antes do tempo determinado para a ovulação.
- Dia 21 a meio da tarde e ao fim do dia – Observações: Ecografia – égua não ovulada, tamanho do folículo constante e o útero com edema fisiológico bastante acentuado e com líquido. Acções: administração de ocitocina das duas vezes para tentar eliminar o excesso de sêmen e o líquido inflamatório formado após inseminação.
- Dia 22 – Observações: Ecografia – égua não ovulada, tamanho do folículo constante e o útero com edema fisiológico bastante acentuado e com líquido. Acções: nova administração de ocitocina de manhã para eliminar o restante líquido.
- Dia 22 às 13h00 – Observações: Ecografia – tamanho do folículo constante e o útero com edema fisiológico bastante acentuado e com líquido. Acções: administração de dinoprost tromethamine (princípio activo do produto comercial Dinolytic) no início da tarde, para induzir novo cio.

Dia 22 às 15h00 – Observações: Ecografia – tamanho do folículo constante e o útero com edema fisiológico bastante acentuado e com líquido. Acções: suspensão da inseminação.

Dia 26 – Acções: administração de dinoprost tromethamine para voltar a tentar sincronizar o cio.

Dia 30 – Novo controlo reprodutivo: Ecografia – desenvolvimento folicular no ovário direito, com um folículo de 34mm e o útero com edema moderado. Acções: administração de 2cc de ocitocina dado que a égua começava a apresentar líquido sempre que entrava em cio.

Dia 31 e 32 – Observações: Ecografia – folículo em crescimento com 36,5mm e 39,5mm respectivamente em cada dia e o útero com edema fisiológico moderado. Acções: continuação da administração de 2cc de ocitocina para continuar a expulsar o líquido e iniciação do tratamento com 20cc de enrofloxacin (princípio activo do produto comercial Baytril).

O enrofloxacin é um antibiótico com boa actividade contra bacilos e cocos gram-negativos como *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella spp.*, *Enterobacter*, *campylobacter*, *Shigella*, *Salmonella*, *Aeromonas*, *Haemophilus*, *Proteus*, *Yersinia*, *Serratia* e *Vibrio*, só devendo ser usado em cavalos adultos quando outros antibióticos forem inapropriados. Neste caso específico, o objectivo era tratar a endometrite de forma não invasiva.

Dia 32 às 15h00 – Acções: administração sulfato de gentamicina intra-uterina para actuar localmente e novamente 2cc de ocitocina.

Dia 33 – Observações: Ecografia – o folículo evoluiu para 42mm. Acções: manteve-se a medicação de 2cc de ocitocina e 20cc de enrofloxacin.

Dia 34 às 8h00 – Observações: Ecografia – égua a ovular. Acções: continuação do tratamento com 20cc de enrofloxacin.

Dia 34 às 9h30 – Observações: Ecografia – égua ovulada. Acções: inseminação com sémen congelado do garanhão W.

Dia 35 – Acções: lavagem com 2L de lactato de Ringer e administração de 2cc de ocitocina. Protocolo usado sempre após inseminação para diminuir a resposta inflamatória da égua ao sémen.

Dia 47 – Observações: Ecografia – diagnóstico de gestação inconclusivo.

Dia 51 – Observações: Ecografia – novo diagnóstico de gestação negativo; folículo do ovário direito com 43mm, ovário esquerdo multifolículo. Acções: continuação do mesmo protocolo de medicação, enrofloxacin e ocitocina, e adição de sulfato de gentamicina intra-uterina. Administração de hCG (princípio activo do produto comercial Pregnyl), com o objectivo de induzir a ovulação do folículo do ovário direito.

Dia 52, 53 e 54 – Observações: Ecografia – características ováricas e uterinas permanecem iguais. Acções: continuação da administração de enrofloxacin, ocitocina e 1 L de lactato de Ringer associado a sulfato de gentamicina.

Dia 54 ao 12h00 – Observações: Ecografia – folículo a regredir. Acções: administração de 2cc de ocitocina para prevenir a acumulação de líquido no útero.

Dia 54 o resto do dia – Observações: Ecografia – Mais quatro medições de quatro em quatro horas foram realizadas nesse dia e o cenário manteve-se: folículo a regredir e ausência de ovulação.

Dia 55 – Observações: Ecografia – folículo com 39 mm, confirmação da regressão do folículo. Acções: administração de enrofloxacin e ocitocina.

Dia 58 – Observações: Ecografia – avaliação do estado de regressão do folículo, que permanecia com um diâmetro de 39mm e o útero com edema fisiológico moderado. Acções: administração de 2cc ocitocina, 10cc de marbofloxacin (princípio activo do produto comercial Marbocyl) e 2 pipetas de hCG (Pregnyl), para tentar induzir a ovulação do folículo persistente.

O marbofloxacin é um agente bactericida com actividade semelhante a outros, actuando contra bactérias gram-positivas e negativas. Embora não haja indicação no cavalo é administrado uma dose semelhante à dos bovinos.

O uso de diferentes antibióterapias aplicadas à égua durante a sua estadia no centro deve-se a esta apresentar reacções inflamatórias constantes após a inseminação. É por hábito na clínica fazer-se o cruzamento de antibióticos visto não se saber ao certo o agente em causa, isto, porque não se faz análises ao líquido inflamatório devido à demora em obter-se os resultados por parte do laboratório. É portanto aplicado antibióterapia localmente, por exemplo o sulfato de gentamicina, conjuntamente com antibióterapia endovenosa. Iniciou-se o tratamento com Enrofloxacin, durante 8 dias (limite médio para o uso de antibióticos), ao fim desse tempo mudou-se para Marbofloxacin.

Dia 59 – Observações: Ecografia – folículo de 41mm, útero com edema média. Acções: continuação da administração da mesma terapêutica, 2cc de ocitocina e 10cc de marbofloxacin.

Dia 59 às 12h30, 16h30 e 21h00 – Observações: Ecografia – folículo de 41mm, útero com edema fisiológico médio.

Dia 59 às 23h00 – Observações: Ecografia – sinais de ovulação. Acções: inseminação com sémen congelado do garanhão W, 8 palhinas.

Dia 60 – Observações: Ecografia – égua ovulada do ovário direito e o útero com edema fisiológico mas sem líquido. Acções: aplicação do protocolo comumente usado na pós-inseminação com sémen congelado – lavagem

com 1L de lactato de Ringer mais 30cc de sulfato de gentamicina intra-uterina, 2cc de ocitocina e marbofloxacin.

Dia 61 – Observações: Ecografia – ovulada e útero com edema fisiológico, sem líquido. Acções: nova lavagem com lactato de Ringer e administração de 2cc de ocitocina e marbofloxacin, dada a predisposição desta égua para produzir uma resposta inflamatória ao sémen.

Dia 62 – Acções: administração de 2cc de ocitocina e 10cc de marbofloxacin.

Dia 73 – Observações: Ecografia – diagnóstico negativo.

Dia 74 – Repetição do diagnóstico de gestação: Ecografia – diagnóstico negativo.

Foi feita uma última tentativa de voltar a sincronizar a égua no dia seguinte de modo a que esta ficasse gestante na época reprodutiva corrente.

Dia 75 – Observações: Ecografia – ovário direito com folículo de 40mm, o esquerdo multifolicular e o útero com edema moderado. Acções: administração de 20cc de novo antibiótico, de ceftiofur (Excenell) intra-uterino e 1cc de acetato de deslorelina, um método alternativo para a indução da ovulação quando esta já foi induzida duas ou mais vezes com hCG.

Dia 76 – Novo controlo reprodutivo. Observações: Ecografia: folículo do ovário direito em crescimento, agora com 41mm. Acções: administração de ceftiofur e adição de 2cc de ocitocina.

Dia 77 – Observações: Ecografia – evolução do folículo para 42mm.

Dia 77 às 11h00 – Observações: Ecografia – égua ovulada. Acções: inseminação com 17 palhinhas de sémen congelado do garanhão W.

Dia 77 às 24h15 – Acções: lavagem com 2L de lactato de Ringer e administração de 2cc de ocitocina, mais uma vez protocolo usado após inseminação com sémen congelado para prevenir a resposta inflamatória da égua ao sémen.

Dia 78 – Acções: lavagem com 2L de lactato de Ringer e administração de 2cc de ocitocina.

Esta foi a última tentativa para tentar que a égua entrasse em gestação. Dias depois o diagnóstico voltou a ser negativo, esta égua acabou por não ser coberta nesta época reprodutiva.

Na Tabela 3 estão esquematizadas por ordem cronológica todas as intervenções e os resultados das observações realizadas à égua 3.

Data	Hora	Exame			Observações	Produtos
		OD	OE	Útero		
9/5	8:10	36 x 39	31 x 25	++		
10/5	9:30	41mm	MF	++		
11/5	8:00	43mm	MF	++	Alguma dor à palpação OD	
	9:15	43mm	MF	++	Alguma dor à palpação OD	
	10:45	43mm	MF	++		
	12:00	Ovulada	MF	++	IA com sémen do W	
12/5	9:00	Corpo Lúteo	N.S.	+	1 L Lactato de Ringer	2cc Ocitocina
25/5		N.S.	30mm		Diagnóstico – (ver amanhã)	
26/5		N.S.	34mm	++	Ver amanhã	
27/5	15:30	N.S.	36,8mm	++		1cc Acetato de deslorelina
28/5	12:00	N.S.	39mm	++		
29/5	7:00		39mm	+++	IA antes da ovulação (9h)	
	16:30		39mm	+++	N/ ovulada. Líquido	2cc Ocitocina
	20:00		39mm	+++	N/ ovulada	2cc Ocitocina
30/5	9:00		39mm	+++	N/ ovulada. Líquido	2cc Ocitocina
	13:00		39mm	+++	N/ ovulada. Líquido	2cc Dinoprost Tromethamine (Dinolytic)
	15:00		39mm	+++	N/ ovulada. Líquido	
03/6						2cc Dinoprost Tromethamine (Dinolytic)
07/6	11:00	34mm	N.S.	++	Ver amanhã	2cc Ocitocina
08/6	10:00	36,5mm	N.S.	++	Dar Deslorelina amanhã	2cc Ocitocina 20cc Enrofloxacin (Baytril)
09/6	9:00	39,5mm	N.S.	++	Dar Acetato de deslorelina á tarde	2cc Ocitocina 20cc Enrofloxacin (Baytril)
	15:00	39,5mm	N.S.	++	Sulfato de Gentamicina IU (Gentamicina)	2cc Ocitocina
10/6	21:00	42mm	N.S.	++	20cc Enrofloxacin (Baytril)	2cc Ocitocina

Tabela 3 – Historial clínico da égua 3 no centro.

Legenda: OD e OE – ovário direito e esquerdo respectivamente; N.S. – Não de significativo; M.F. – multifolicular; IA – Inseminação artificial; (+), (++) , (+++) - diferentes graus de edema fisiológico, pouco, médio e elevado; IU – Intra-uterina.

Data	Hora	Exame			Observações	Produtos
		OD	OE	Útero		
11/6	8:00	A ovular	N.S.	++		20cc Enrofloxacim (Baytril)
	9:30	Ovulada	N.S.	++	IA com sémen do W	
12/6	8:00				Lavado 2 L Lactato de Ringer	2cc Ocitocina
24/6					Diagnóstico inconclusivo 13 dias	
28/6		43mm	MF	++	Diagnóstico – Dar Sulfato de Gentamicina. Dar 2 pipetas hCG (Pregnyl) hoje	20cc Enrofloxacim (Baytril) 2cc Ocitocina
29/6	12:00	43mm	MF	++	Sulfato de Gentamicina (Gentamicina) + 1L Lactato de Ringer	2cc Ocitocina 20cc Enrofloxacim (Baytril)
	16:00					
	20:00					
	24:00					
30/6	8:00	43mm	MF	++	Sulfato de Gentamicina (Gentamicina) + 1L Lactato de Ringer	2cc Ocitocina 20cc Enrofloxacim (Baytril)
	12:00	43mm	MF	++		
	16:00	43mm	MF	++	Folículo redondo	
01/7	8:00	43mm	N.S.	++	Sulfato de Gentamicina (Gentamicina) + 1L Lactato de Ringer	20cc Enrofloxacim (Baytril) 2cc Ocitocina
	12:00	41mm	N.S.	++	Folículo redondo, + pequeno	2cc Ocitocina
01/7	16:00	41mm	N.S.	++		
	20:00	41mm	N.S.	++	Não ovulada, a regredir folículo	
	24:00	41mm	N.S.	++	Não ovulada, a regredir folículo	
	04:00	39mm	N.S.	++	Não ovulada, a regredir folículo	
02/7	07:00	39mm	N.S.	++	Não ovulada, a regredir folículo	
	11:00	39mm	N.S.	++	Não ovulada 2cc Ocitocina	20cc Enrofloxacim (Baytril)

Tabela 3 – Continuação (1) do historial clínico da égua 3 no centro.

Legenda: OD e OE – ovário direito e esquerdo respectivamente; N.S. – Não de significativo; M.F. – multifolicular; IA – Inseminação artificial; (+), (++) , (+++) - diferentes graus de edema fisiológico, pouco, médio e elevado.

Data	Hora	Exame			Observações	Produtos
		OD	OE	Útero		
05/7	9:00	39mm	N.S.	++	2 pipetas hCG (Pregnyl) + 10cc Marbofloxacin (Marbocyl)	2cc Ocitocina
06/7	9:00	41mm	N.S.	++	10cc Marbofloxacin (Marbocyl)	2cc Ocitocina
	12:30	41mm	N.S.	++		
	16:30	41mm	N.S.	++		
	21:00	41mm	N.S.	++		
	23:00	A ovular			IA com sémen do W (8 palhinhas)	
07/7	9:00	Ovulada	N.S.	++ sem líquido	1 L Lactato Ringer 30cc Sulfato de Gentamicina (Gentamicina)	2cc Ocitocina 10cc Marbofloxacin (Marbocyl)
08/7		Ovulada	N.S.	++ sem líquido	1L Lactato de Ringer	2cc Ocitocina 10cc Marbofloxacin (Marbocyl)
09/7	9:00	Ovulada	N.S.	++ sem líquido		2cc Ocitocina 10cc Marbofloxacin (Marbocyl)
20/7					Diag. Gestação –	
21/7					Diag. Gestação –	
22/7	16:00	40mm	MF	++	20cc Ceftiofur (Excenell)	1cc Acetato de Deslorelina
23/7	11:00	41mm	MF	++	20cc Ceftiofur (Excenell)	2cc Ocitocina
24/7	7:30	42mm	MF	++		
	11:00	Ovulada			IA c/ 17 palhinhas de sémen do W	
	24:15			Pouco líquido	Lavada com 2L Lactato de Ringer	2cc Ocitocina
25/7	9:00			Pouco líquido	Lavada com 2L Lactato de Ringer	2cc Ocitocina

Tabela 3 – Continuação (2) do historial clínico da égua 3 no centro.

Legenda: OD e OE – ovário direito e esquerdo respectivamente; N.S. – Não de significativo; M.F. – multifolículo; IA – Inseminação artificial; (+), (++) , (+++) - diferentes graus de edema fisiológico, pouco, médio e elevado.

3.6. Discussão dos casos clínicos

A descrição dos casos clínicos acima relatados foi feita com o intuito de evidenciar as vantagens que a reprodução assistida e as tecnologias associadas têm na eficiência reprodutiva e, consequentemente, na produtividade.

No primeiro caso a égua 1, era uma égua com historial de insucesso reprodutivo no ano anterior e que após início da nova época reprodutiva ainda não tinha demonstrado sinais de cio. A estimulação natural nesta égua, através de um correcto maneio, do fotoperíodo e pela presença do macho não surtiu efeito e como o intuito dos donos era que a égua produzisse um poldro este ano foi contactado o Médico Veterinário do centro para avaliação reprodutiva da égua. Através deste, e após recolha do historial reprodutivo, foi decidido aplicar a estimulação hormonal na sincronização do cio.

O segundo caso, é um exemplo ilustrativo do efectivo equino nacional. A égua 2 é uma antiga égua de competição e só após o término da sua carreira desportiva foi iniciada na vida reprodutiva. Embora ainda não seja considerada uma égua velha (tem 8 anos), é uma égua imatura reprodutivamente, sendo este o segundo ano em que é usada na reprodução. Este tipo de éguas têm maior dificuldade em expressar o cio, tendo sido por isso necessário despoletar o cio com o auxílio da administração de hormonas exógenas. Esta égua exemplifica também a necessidade de acoplar a estimulação hormonal às técnicas de inseminação artificial. Pelo segundo ano consecutivo não se consegue cobrir a égua através da cópula natural. Não recorrer ao uso da IA, tornaria difícil contornar o problema específico que afectava a fertilidade desta égua.

Aplicar apenas as técnicas de reprodução padrão a estas éguas é meio caminho andado para o insucesso reprodutivo. Providenciar-lhe os benefícios das novas práticas de maneio reprodutivo é obrigatório para no final se obterem descendentes.

A utilização de agentes de sincronização do cio no maneio reprodutivo desempenhou um papel fundamental no sucesso reprodutivo destas duas éguas. Entretanto, para que aquela pudesse ser eficiente, a utilização das drogas indutoras de ovulação e de sincronização do cio teve de ser realizada com o acompanhamento diário do estro pelo veterinário, através de palpação rectal e ultrasonografia, monitorizando o crescimento folicular e o edema uterino, para que a inseminação fosse realizada no momento adequado e não houvesse falhas na indução. Igualmente imprescindível é possibilitar que o Médico Veterinário institua todos os tratamentos necessários, como a administração de antibioterapia, aplicação de lavagens uterinas, seguida da administração de ocitocina, quando há presença de líquido no útero. Conjuntamente, a utilização destes agentes indutores são uma importante ferramenta na aplicação das biotecnologias reprodutivas, entre elas, a IA, o uso de sémen refrigerado ou congelado e a TE. Os agentes indutores do cio e da ovulação actuam reduzindo o intervalo pré-

ovulatório, facilitando a sincronização da ovulação e, logo, sincronizando as dadoras e receptoras nos programas de TE e otimizando o uso do garanhão, bem como das doses de sémen inseminadas.

O terceiro e último caso, ilustra na perfeição casos incontornáveis sem as novas tecnologias de reprodução assistida. O proprietário queria cobrir a égua com o garanhão W, o qual se encontra no Reino Unido. Uma das principais mudanças na indústria do cavalo em Portugal foi certamente a aceitação generalizada da refrigeração e da congelação de sémen. Sem a difusão da venda de sémen congelado além fronteiras, produzir descendentes destes dois animais, implicaria maiores custos de transporte dos mesmos. Este caso tem ainda outra particularidade, a tentativa de induzir a gestação na égua ao longo dos quase três meses que esta permaneceu no centro foi infrutífera. A égua foi estimulada várias vezes hormonalmente com diferentes fármacos, tratada com 3 antibióterapias diferentes e foram realizadas várias lavagens uterinas acopladas a antibióterapia intra-uterina e administração de ocitocina, segundo protocolo pós-inseminação com sémen congelado. Mesmo assim, após quatro inseminações a égua retornou a casa sem um prognóstico definido, acabando por dias mais tarde, já com a égua de volta à exploração, o diagnóstico de gestação ter sido negativo.

Dada a conjuntura verificada, e caso houvesse urgência por parte do proprietário em cobrir a égua ainda este ano, o veterinário teria diferentes situações a ponderar, definir a capacidade ou não desta égua conseguir produzir um embrião e delimitar a origem da falha de concepção. Se a égua conseguisse produzir embriões, era uma boa candidata a transferência de embriões, já que tem uma enorme predisposição para o aparecimento de endometrites. Se se observasse um histórico de falhas ovulatórias repetidas ou a incapacidade desta égua na concepção ou na manutenção embrionária precoce, o Médico Veterinário teria de ponderar o uso de técnicas mais avançadas como a Transferência de Oócitos. Esta técnica tem aplicação prática limitada em protocolos clínicos de rotina em Portugal e seria um desafio aplicá-la.

Em todo o caso, foi igualmente averiguado que o sémen do garanhão era de baixa congelabilidade. Como a mobilidade espermática após congelação/descongelação do sémen era relativamente pobre, esta poderá ter sido uma das causas para a égua falhar na concepção em inseminações sucessivas, tornando a cobertura da égua por este garanhão difícil. Neste caso o Médico Veterinário deveria avisar o proprietário que a taxa de concepção da sua égua com este garanhão seria muito reduzida e, eventualmente, aconselhá-lo a recorrer a técnicas mais avançadas como a Injecção Intracitoplasmática de Sémen (ICSI). Esta técnica seria o método ideal para produzir poldros de garanhões com espermatozóides de má qualidade após congelação.

Os casos supracitados não deixam dúvida das repercussões positivas que os tremendos avanços no controlo reprodutivo equino originaram. A aceitação das tecnologias reprodutiva não depende contudo exclusivamente do sucesso da tecnologia, mas da atitude dos criadores e veterinários e da relação custo/benefício para a indústria e das associações da raça.

4. Conclusão

Embora o cavalo tenha provavelmente sido um dos primeiros animais a experimentar os benefícios de algumas das Técnicas de Reprodução Assistida, a sua implantação arrastou-se um pouco em Portugal no que diz respeito à aplicação de novas práticas de manejo, da inseminação artificial e da transferência de embriões, possivelmente devido à falta de interesse demonstrado pela indústria do cavalo. A IA e TE, em particular, têm sido recebidas com algum cepticismo em Portugal. A associação da raça Puro-Sangue Lusitano aceitou apenas uma (a IA) das muitas tecnologias reprodutivas desenvolvidas nos últimos 20 anos pela comunidade científica mundial e, assim, poucos hábitos mudaram ao longo dos anos. Mas agora o cavalo está de volta e a ganhar terreno em relação a outras grandes espécies domésticas na aplicação dos muitos avanços tecnológicos dos últimos anos.

Em Portugal, está-se a viver um ponto de viragem que se espera direccionado para a modernidade do melhoramento genético que se impõe. O criador e o veterinário têm agora acesso a técnicas que permitem a avaliação da qualidade do sémen, e as melhorias nos diluidores e crioprotectores resultaram numa verdadeira explosão no transporte e na inseminação de sémen refrigerado e congelado. Em paralelo, melhorias na indução da ovulação e sincronização, estimulação exógena de múltiplas ovulações e a simplificação de métodos mais eficientes para transferência não cirúrgica de embriões a éguas receptoras, têm juntos contribuído para um aumento similar na aplicação da transferência de embriões em equinos, apesar das restrições dos registos da raça.

Espera-se que num futuro próximo se providencie assistência técnica para a organização de um centro de transferência de embriões comercial, de modo a simplificar a recolha de embriões, evitando preocupações na disponibilidade e sincronização das éguas receptoras, na transferência e nos processos de congelamento e armazenamento de embriões. Não há dúvida de que a TE irá ter impactado na economia da indústria do cavalo.

O estágio realizado na Lusopecus com duração de 3,5 meses e a elaboração desta dissertação, possibilitaram, em conjunto, não só a aplicação dos conhecimentos adquiridos anteriormente, mas também a aquisição de novos conhecimentos práticos na área da clínica de equinos. Tornou-se um excelente complemento para a minha formação, ajudando na preparação do meu futuro profissional. Não restam dúvidas que todo o tempo investido na pesquisa e elaboração da dissertação de Mestrado contribuiu decisivamente para uma melhor compreensão acerca dos mecanismos reprodutivos da espécie equina e também para uma consciencialização de todos os

problemas burocráticos, económicos que todos nós como veterinários atravessamos no país. A escolha do tema da dissertação deveu-se ao seu carácter global, à sua importância tanto a nível do melhoramento genético da raça Lusitana como a nível económico.

Actualmente, é necessário que os Médicos Veterinários disponham de conhecimentos e meios técnicos que permitam responder às necessidades de uma actividade clínica tão exigente, como a do cavalo, obrigando a uma actualização constante. Também a avaliação minuciosa e crítica e a comunicação com o cliente são fundamentais. É responsabilidade do MV maximizar a saúde reprodutiva e a eficiência de todos os animais ao seu cuidado, para que as falhas de concepção e gestação sejam minimizadas. Tal implica implementar métodos auxiliares de diagnóstico e estratégias terapêuticas para as éguas e garanhões com problemas reprodutivos.

De longe, o resultado mais importante que surge a partir deste estudo é a conclusão que éguas e garanhões bem geridos podem alcançar altos níveis de desempenhos reprodutivos, sendo algo possível de concretizar no nosso país na área da reprodução equina.

Bibliografia

- Agrícola R., Chaveiro A., Robalo Silva J.R., Horta A. & Silva F.M. (2008). Seasonal changes in semen quality and freezability in lusitano stallions: A flow cytometric study. *Proceedings of the 5th International Symposium on Stallion Reproduction: Animal Reproduction Science*, 107, pp. 302-303.
- Allen W.R., Wilsher S., Tiplady C. & Butterfield R.M. (2004). The influence of maternal size on pre and postnatal growth in the horse: III Postnatal growth. *Reproduction*, 127, 67-77.
- Allen W.R. (2005). Development and application of the modern reproductive technologies to horse breeding. *Reproduction Domestic Animals*, 40, 310-329.
- Almeida Rodrigo Coelho, (2005a). A influência do “acaso” na criação do cavalo Lusitano. *Equisport online – artigos de Actualidade*. Acedido em Julho de 2010, disponível em: <http://www.equisport.pt/pt/artigos/actualidade/a-influencia-do-acaso-na-criacao-do-cavalo-lusitano>.
- Almeida Rodrigo Coelho, (2005b). O marketing da Raça Lusitana numa economia de Oportunidade e de União. *Equisport online – Artigos de actualidade*. Acedido em Julho de 2010, disponível em: <http://www.equisport.pt/pt/artigos/actualidade/o-marketing-da-raca-lusitana-numa-economia-de-oportunidade-e-de-uniao>.
- Alvarenga M.A., Carmo M.T. & Oliveira J.V. (2009). *Transferência de Embriões na Espécie Equina*. São Paulo: Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu. Manual cedido no Curso Teórico-Prático de Biotecnologias Reprodutivas em Equinos (2010), realizado no Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar (ICBAS).
- Alvarenga M.A. (2010a). *Colheita e Transferência de Embriões Equinos – Passo a Passo*. Porto: Manual cedido no Curso Teórico-Prático de Biotecnologias Reprodutivas em Equinos, realizado no Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar (ICBAS).
- Alvarenga M.A. (2010b). *Preservação de Sêmen Equino – Problemas e Soluções*. Porto: Manual cedido no Curso Teórico-Prático de Biotecnologias Reprodutivas em Equinos, realizado no Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar (ICBAS).
- Alvarenga M.A. (2010c). *Transferência de Oócitos e ICSI em Equinos*. Porto: Manual cedido no Curso Teórico-Prático de Biotecnologias Reprodutivas em Equinos realizado no Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar (ICBAS).
- American Museum of Natural History, (2008/2009). *The Horse – Domesticating Horses*. Acedido em Junho de 2010, disponível em: <http://www.amnh.org/exhibitions/horse/?section=domesticating#>.
- Associação Portuguesa de Criadores do Cavalo Puro e Sangue Lusitano (APSL). *O Cavalo Lusitano*. Acedido em Junho de 2010, disponível em <http://www.cavalo-lusitano.com/>
- Aurich J. & Aurich C. (2006). Developments in European horse breeding and consequences for veterinarians in equine reproduction. *Reproduction in Domestic Animals*, 41, 275-279.

- Ax R.L., Dally M., Didion B.A., Lenz R.W., Love C.C., Varner D.D., Hafez B. & Bellin M.E. (2004a). Avaliação de sêmen. In Hafez E.S.E. & Hafez B. (Eds.). *Reprodução Animal*. (7ª ed., tradução brasileira). (pp. 369-379), Kiawah Island. South Carolina, USA: Manole.
- Ax R.L., Dally M., Didion B.A., Lenz R.W., Love C.C., Varner D.D., Hafez B. & Bellin M.E. (2004b). Inseminação Artificial. In Hafez E.S.E. & Hafez B. (Eds.). *Reprodução Animal*. (7ª ed., tradução brasileira). (pp. 381-394), Kiawah Island. South Carolina, USA: Manole.
- Bearden, H.J. & Fuquay, J.W. (1998). *Applied animal reproduction* (4ª ed.). (cap. 1, 13 e 18). Upper Saddle River, USA: Prentice-Hall.
- Betteridge, K.J. (2003). A history of farm animal embryo transfer and some associated techniques. *Animal Reproduction Science*, 79, 203-244.
- Blanchard, T.L., Dickson, D.V., Schumacher, J., Love, C.C., Brinsko, S.P. & Rigby, S.L. (2003). *Manual of equine reproduction*. (2ª ed.). (cap. 5, 12, 13, 14 e 17). St. Louis: Mosby.
- Blanchard T.L. (2007). The subfertile stallion. In Samper, J.C., Pycock, J.F. & McKinnon, A.O.; (Eds.). *Current therapy in equine reproduction*. (2º ed.). (pp. 237-243). St. Louis, USA: Saunders Elsevier.
- Bosh K.A., Powell D., Neibergs J.S., Shelton B. & Zent W. (2009a). Impact of reproductive efficiency over time and mare financial value on economic returns among throughbred mares in central Kentucky. *Equine Veterinary Journal*, 41 (9), 889-894.
- Bosh K.A., Powell D., Shelton B. & Zent W. (2009b). Reproductive performance measures among throughbred mares in central Kentucky, during the 2004 mating season. *Equine Veterinary Journal*, 41, 883-888.
- Bradecamp E.A. (2007). Estrous Synchronization. In Samper, J.C., Pycock, J.F. & McKinnon, A.O. (Ed.). *Current therapy in equine reproduction*. (2º ed.). (pp. 22-25). St. Louis, USA: Saunders Elsevier.
- Brinsko S.P., Spooner J.A., Blanchard T.L., Love C.C. & Varner D.D. (2004). Relationships among sperm membrane integrity, motility, and morphology in first and third ejaculates of sexually rested stallions. *Proceedings of 50th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners, Denver*.
- Brinsko S.P. (2006). Insemination doses: How low can we go?. *Theriogenology*, 66, 543-550.
- Buiten A. V., Westers P. & Colenbrander B. (2003). Male, female and management risk factors for non-return to service in Dutch mares. *Preventive Veterinary Medicine*, 61, 17-26.
- Carnevale, E.M. (2006). Vitriification of equine embryos. *Veterinary Clinic, North American Equine Practice*, Dec; 22, 831-841.
- Carnevale E.M., (2007). Collection and transfer of oocytes in mares. In Samper, J.C., Pycock, J.F. & McKinnon, A.O. (Eds.). *Current therapy in equine reproduction*. (2º ed.). (pp. 289-295). St. Louis, USA: Saunders Elsevier.

- Carnevale, E.M. (2008). Clinical considerations regarding assisted reproductive procedures in horses. *Journal of Equine Veterinary Science*, vol. 28, 686-690.
- Carvalho O. M. Jr. (1998). A "AIDS" do cavalo: Anemia infecciosa equina. *Revista de Educação Continuada do CRMV-SP*. São Paulo, vol. 1, 16-23.
- Castejon R., (2005). Importância económica do sector equestre. *Equisport online – Artigos de actualidade*. Acedido em Julho de 2010, disponível em: <http://www.equisport.pt/pt/artigos/actualidade/importancia-economica-do-sector-equestre>
- Costa, S. (2009, Outubro). Animais de eleição. *Revista Profissional de Medicina Veterinária, Veterinária Actual*, 21, 14-19.
- Coutinho da Silva M.A. (2008). When should a mare go for assisted reproduction?. *Theriogenology*, 70, 441-444.
- Cruz F. & Alvarenga M.A. (2010). *Criopreservação de embriões de equinos*. Porto: Manual cedido no Curso Teórico-Prático de Biotecnologias Reprodutivas em Equinos, realizado no Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar (ICBAS).
- Decreto de Lei n.º 48/2007 de 27 de Fevereiro. *Diário da República nº 90 – II Série*. Ministério da Agricultura, Desenvolvimento Rural e das Pescas. Lisboa.
- Dobal S.J. (2009). *Export trading – What are exporting advantages*. Articlesbase – free online articles directory. Acedido em Agosto de 2010, disponível em: <http://www.articlesbase.com/international-business-articles/export-trading-what-are-exporting-advantages-941564.html>
- Duarte J.C. (2004, Março). *Produção de Equinos*. Lisboa: Aula de Mestrado em Produção Animal da Universidade Técnica de Lisboa.
- Duarte J.C. (2006, Maio). *Utilizem a genética que entenderem ... seja qual for a distância que os separe*. Vila Franca de Xira: VII Jornadas Técnico-Ciêntificas de Medicina Veterinária.
- Duarte J.C. (2006, Novembro). *Reprodução como elemento melhorador das performances da espécie equina*. Lisboa: Aula leccionada na Universidade Lusófona.
- Duarte J.C. (2007a, Outubro). *Aspectos actuais da Reprodução Equina*. Horta, Faial: Conferência sobre criação de cavalos Lusitanos.
- Duarte J.C. (2007b, Maio). Vila Franca de Xira: VIII Jornadas Técnico-Ciêntificas de Medicina Veterinária.
- Duarte J.C. (2007c, Março). *Reprodução Equina – Evolução do seu controlo em Portugal*. Congresso na Universidade de Évora.
- Duarte J.C. (2007d). *Reprodução Equina*. Évora: Aula leccionada na Universidade de Évora.
- Duarte J.C. (2008a). *Aspectos Actuais da Reprodução Equina*. São Miguel, Açores: XVII Congresso Nacional de Zootecnia.
- Duarte J.C. (2008b). *Centro de colheita e congelação de sémen equino – Perspectivas*. Vila Franca de Xira: IX Jornadas Técnico-Ciêntificas.

- England, G. (2005). *Fertility and obstetrics in the horse*. (3ª ed.). (cap. 24), USA: Blackwell Publishing.
- Estrada A.J. & Samper J.C. (2007). Evaluation of raw semen. In Samper, J.C., Pycck, J.F. & Mckinnon, A.O. (Eds.). *Current therapy in equine reproduction*. (2º ed.). (pp. 253-257). St. Louis, USA: Saunders Elsevier.
- Faria M.F. (1991a). *Inseminação Artificial em Equinos*. Dissertação para efeitos de concurso à categoria de professor coordenador. Coimbra: Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Coimbra.
- Faria M.F. (1991b). *O Uso das Hormonas na Reprodução dos Equinos*. Lição proferida no âmbito das provas públicas para professor coordenador. Coimbra: Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Coimbra.
- Foot R. H. (2003). Fertility estimation: a review of past experience and future prospects [abstract]. *Animal Reproduction Science*, 75, 119-139.
- Fragoso J.N. (2007, Dezembro). O Sector Equino está Estagnado. *Revista Profissional de Medicina Veterinária, Veterinária Actual*, 3.
- Gamboa S., Faria M.M., Santos J.R. (2009). Seminal traits, suitability for semen preservation and fertility in the native Portuguese horse breeds Puro Sangue Lusitano and Sorraia: Implications for stallion classification and assisted reproduction. *Animal Reproduction Science*, 113, 102-113.
- Ginther, O. J., (1985). Dynamic physical interactions between the equine embryo and uterus. *Equine Veterinary Journal*, 17, 41-47.
- Goulburn Valley Equine Hospital (GVEH). Acedido em Julho de 2010. Disponível em: http://www.gvequine.com.au/breeding_efficiency.htm
- Graham J.K. & Card C. (2007). Preservation of genetics from dead or dying stallions. In Samper, J.C., Pycck, J.F. & Mckinnon, A.O. (Eds.). *Current therapy in equine reproduction*. (2º ed.). (pp. 281-284). St. Louis, USA: Saunders Elsevier.
- Hafez E.S.E. (2004). Preservação e criopreservação de gâmetas e embriões. In Hafez E.S.E. & Hafez B. (Eds.). *Reprodução Animal*. (7ª ed., tradução brasileira). (pp. 435-446). Kiawah Island. South Carolina, USA: Manole.
- Hafez E.S.E. & Hafez B. (2004). Equinos. In Hafez E.S.E. & Hafez B. (Eds.). *Reprodução Animal*. (7ª ed., tradução brasileira). (pp. 193-218). Kiawah Island. South Carolina, USA: Manole.
- Hafez E.S.E. & Hafez B. (2004b). Micromanipulação de gâmetas e embriões: Fertilização in vitro e transferência de embriões (FIV/TE). In Hafez E.S.E. & Hafez B. (Eds.). *Reprodução Animal*. (7ª ed., tradução brasileira). (pp. 447-469). Kiawah Island. South Carolina, USA: Manole.
- Hinrichs K. & Young-Ho Choi, (2005). Assisted Reproductive Techniques in the Horse. *Clinical techniques in Equine Practice*, 210-218.
- Hinrichs K. (2007). In vitro fertilization. In Samper, J.C., Pycck, J.F. & Mckinnon, A.O. (Eds.). *Current therapy in equine reproduction*. (2º ed.). (pp. 308-309). St. Louis, USA: Saunders Elsevier.

- Jainudeen M.R. & Hafez E.S.E. (2004a). Diagnóstico de gestação. In Hafez E.S.E. & Hafez B. (Eds.). *Reprodução Animal*. (7ª ed., tradução brasileira). (pp. 399-408). Kiawah Island. South Carolina, USA: Manole.
- Jainudeen M.R. & Hafez E.S.E. (2004b). Falha reprodutiva em machos. In Hafez E.S.E. & Hafez B. (Eds.). *Reprodução Animal*. (7ª ed., tradução brasileira). (pp. 399-408). Kiawah Island. South Carolina, USA: Manole.
- Jainudeen M.R. & Hafez E.S.E. (2004c). Falha reprodutiva em fêmeas. In Hafez E.S.E. & Hafez B. (Eds.). *Reprodução Animal*. (7ª ed., tradução brasileira). (pp. 399-408). Kiawah Island. South Carolina, USA: Manole.
- Jainudeen M.R., Wahid H. & Hafez E.S.E. (2004). Indução da ovulação, produção e transferência de embriões. In Hafez E.S.E. & Hafez B. (Eds.). *Reprodução Animal*. (7ª ed., tradução brasileira). (pp. 409-434). Kiawah Island. South Carolina, USA: Manole.
- King A.M. (2006). Development, advances and applications of diagnostic ultrasound in animals. *The Veterinary Journal*, 171, 408-420.
- Landim-Alvarenga F.C., Fernandes C.B., Devito L.G., Derussi A.A.P., Blanco I.D.P. & Alvarenga M.A. (2008). New assisted reproductive technologies applied to the horse industry: successes and limitations. *Animal Reproduction*, vol. 5 (3/4), 67-82.
- Long C.R., Walker S.C., Tang R.T. & Westhusin M.E. (2003). New commercial opportunities for advanced reproductive technologies in horses, wildlife, and companion animals. *Theriogenology*, 59, 139-149.
- Lopes da Costa L., Duarte A.F. & Robalo Silva J. (2007). Biotechnology of Reproduction and Development: from the Biomedical model of enterprise innovation. *A Portrait of State-of-the-Art research at the Technical University of Lisbon*, 259-272. Lisboa: M. Seabra Pereira.
- Lyle S.K. & Ferrer M.S. (2005). Low-dose insemination – why, when and how. *Theriogenology*, 64, 572-579.
- Matthews P. & Morris L. (2007). Low-dose insemination techniques. In Samper, J.C., Pycok, J.F. & Mckinnon, A.O. (Eds.). *Current therapy in equine reproduction*. (2º ed.). (pp. 315-318). St. Louis, USA: Saunders Elsevier.
- McCue P. (2009). Advanced topics in hormone therapy. *Proceedings of the Annual Meeting of the Italian Association of Equine Veterinarians, Bolonha, Itália*, 105-108.
- Mckinnon A.O. & Voss J.L. (1993). The estrous cycle. *Equine Reproduction*, (1º Ed.). (pp. 114-172). Baltimore, EUA: Williams & Wilkins.
- Mckinnon A.O. & Squires E.L. (2007). Embryo transfer and related technologies. In Samper, J.C., Pycok, J.F. & Mckinnon, A.O. (Eds.). *Current therapy in equine reproduction*. (2º ed.). (pp. 319-334). St. Louis, USA: Saunders Elsevier.
- Mckinnon A.O., Trounson A.O. & Silber S.J. (2007). Intracytoplasmic sperm injection. In Samper, J.C., Pycok, J.F. & Mckinnon, A.O. (Eds.). *Current therapy in equine reproduction*. (2º ed.). (pp. 296-307). St. Louis, USA: Saunders Elsevier.

- Mckinnon A.O. (2009). Hormonal control of equine reproduction. *Proceedings of the AAEP Annual Resort Symposium, Vail, EUA*, 138-174.
- Meyers S.A. (2007). Advanced semen tests for genetics from dead or dying stallions. In Samper, J.C., Pycock, J.F. & Mckinnon, A.O. (Eds.). *Current therapy in equine reproduction*. (2º ed.). (pp. 275-280). St. Louis, USA: Saunders Elsevier.
- Ministério da Economia da Inovação e do Desenvolvimento (meid), (2010). Porquê Exportar. Acedido em Julho de 2010, disponível em: <http://www.portugalglobal.pt/PT/Internacionalizar/Paginas/SobrePortugal.aspx>
- Mohamed S. Medan & Abd El-Aty A.M. (2010). Advances in ultrasonography and its applications in domestic ruminants and other farm animals reproduction. *Journal of Advanced Research*, 1, 123-128.
- Morris L.H.A & Allen W.R. (2002). Reproductive efficiency of intensively managed throughbred mares in newmarket. *Equine Veterinary Journal*, 34, 51-60.
- Murchie T. (2005). Stallion infertility. *Proceedings of the NAVC North American Veterinary Conference, Orlando, USA*, 267-269.
- Nacional Institute of Food and Agriculture (NIFA), (2009). *Research in assisted reproductive technologies*. United States Department of Agriculture.
- Newcombe J.R. (2007). The follicle: practical aspects of follicle control. In Samper, J.C., Pycock, J.F. & Mckinnon, A.O. (Eds.). *Current therapy in equine reproduction*. (2º ed.). (pp. 14-21). St. Louis, USA: Saunders Elsevier.
- Nicholas F.W. (1996). Genetic improvement through reproductive technology. *Animal Reproduction Science*, 42, 205-214.
- Oliveira T. (2008). Puro-sangue Lusitano (PSL). *Revista Mundo dos animais*. Acedido em Maio de 2010, disponível em: <http://www.mundodosanimais.com/porta/cavalos/racas/234-puro-sangue-lusitano-psl.html>.
- Papa F.O., Alvarenga M.A. & Dell'Aqua Jr. J.A. (2007). *Manual de andrologia e manipulação de sêmen equino*. São Paulo: Manual do departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu. Manual cedido no Curso Teórico-Prático de Biotecnologias Reprodutivas em Equinos (2010), realizado no Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar (ICBAS).
- Plumb D.C. 2005. *Plumb's Veterinary drug handbook* (5ª ed). (pp. 200-204; 516-521; 424-428; 683-684), Ames, Iowa, USA: Blackwell Publishing.
- Pycock, J.F. & Newcombe, J.R. (1997). Endometritis, salpingitis and fertilisation rates after mating mares with a history of intrauterine intraluminal fluid accumulation. *Equine Veterinary Journal*, 24(suppl.), 109-112.
- Pycock J.F. (2007a). Pregnancy diagnosis in the mare. In Samper, J.C., Pycock, J.F. & Mckinnon, A.O. (Eds.). *Current therapy in equine reproduction*. (2º ed.). (pp. 335-342). St. Louis, USA: Saunders Elsevier.
- Pycock J.F. (2007b). Therapy for mares with uterine fluid. In Samper, J.C., Pycock, J.F. & Mckinnon, A.O. (Eds.). *Current therapy in equine reproduction*. (2º ed.). (pp. 93-104). St. Louis, USA: Saunders Elsevier.

- Pycock J. (2008). Management of the breeding stallion. *Proceedings of the 10th International Congress of World Equine Veterinary Association, Moscovo, Rússia, 216-223.*
- Reed, S.M., Bayly, W.M. & Sellon, D.C. (2004). *Equine internal medicine*, (2^a ed.). (pp. 1059-1065; 1073-1079). St. Louis, USA: Saunders.
- Ricketts S. & Troedsson M.H.T. (2007). Fertility expectations and management for optimal fertility. In Samper, J.C., Pycock, J.F. & Mckinnon, A.O. (Eds.). *Current therapy in equine reproduction*. (2^o ed.). (pp. 53-69). St. Louis, USA: Saunders Elsevier.
- Robalo Silva J. (1985). *Métodos de diagnóstico de gestação nas espécies pecuárias*. Estação Nacional de Selecção e Reprodução Animal: Curso de Formação para Médicos Veterinários Directores de Sub-centros de Inseminação Artificial.
- Robalo Silva J. (1990a). Inseminação Artificial (I.A.): Organização dos serviços de I.A.; Evolução desde 1942 – Serviço de apoio aos criadores de bovinos da Raça Frísia. *Revista A Vaca Leiteira*, 27, 53-54.
- Robalo Silva J. (1990b). Transferência de embriões – Serviço de apoio aos criadores de bovinos da raça Frísia. *Revista A Vaca Leiteira*, 26, 24-25.
- Robalo Silva J. & Nestor Silva J. (1991a). Inseminação artificial – testagem. *Revista A Vaca Leiteira*, 30, 53-56.
- Robalo Silva J. (1991b). *Controlo do ciclo éstrico em ovinos: justifica-se sincronizar com hormonas em Portugal?*. Évora: Jornadas Internacionais sobre Reprodução Ovina e Caprina.
- Robalo Silva J. (1991c). *Hormonas como ferramenta de trabalho: Aplicação ao diagnóstico e ao controlo reprodutivo*. Aveiro: Jornadas sobre Utilização de Hormonas na Fisiopatologia da Reprodução da Vaca Leiteira.
- Robalo Silva J. & Lopes da Costa L. (1993). *Sincronização e selecção de fêmeas bovinas receptoras de embriões*. Espanha: Curso de Formación Continuada de Reproducción, Facultad de Veterinária de León.
- Robalo Silva J. (1993). *Utilização da técnica de transferência de embriões em Portugal*. Espanha: Curso de Formación Continuada de Reproducción, Facultad de Veterinária de León.
- Robalo Silva J. (2006). Recolha e avaliação de ejaculados de garanhão em condições de campo. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 101, 305-309.
- Robalo Silva J., Agrícola R., Barbosa M. & Lopes da Costa L. (2007). Variação sazonal do volume testicular, da produção e qualidade do sémen e do comportamento sexual de cavalos lusitanos. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 102, 119-125.
- Robalo Silva J. (2009a). Características reprodutivas do cavalo puro-sangue Lusitano. In Robalo Silva, Costa L. & Dias F.G. (Eds.). *Manual de Reprodução Equina da Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa*, 21-38.

- Robalo Silva J. (2009). Parâmetros reprodutivos do cavalo puro-sangue Lusitano. *Jornadas "A Investigação equina em Portugal, presente e futuro" do Grupo de Trabalho de Investigação em Equinos (GTIE), XI Expoégua, Golegã.*
- Rocha A.L. (2010). *Aspectos actuais da reprodução equina*. Vila Franca de Xira: XI Jornadas Técnico-Ciêntificas de Medicina Veterinária.
- Rocha A. L. & Alvarenga M. (2010, Abril). *Enfermidades venéreas, diagnóstico e tratamento de infecções uterinas*. Porto. Manual cedido no Curso Teórico-Prático de Biotecnologias Reprodutivas em Equinos, realizado no Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar (ICBAS).
- Rush B.R., (2005). Respiratory diseases of horses. In Allen D.G., Anderson D.P., Jeffcott L.B., Quesenberry K.E., Radostits O.M., Reeves P.T. & Wolf A.M. (Eds.). *The Merck Veterinary Manual*. (9ª ed.). (pp. 1202-1222). USA: Merial.
- Samper J.C. & Tibary H. (2006). Disease transmission in horses. *Theriogenology*, 66, 551-559.
- Samper, J.C., Estrada A.J. & Mckinnon A.O. (2007). Insemination with frozen semen. In Samper, J.C., Pycock, J.F. & Mckinnon, A.O. (Eds.). *Current therapy in equine reproduction*. (2º ed.). (pp. 285-288). St. Louis, USA: Saunders Elsevier.
- Samper, J.C. (2008a). Breeding the problem mare by artificial insemination. *Proceedings of the Annual Convention of the AAEP, San Diego, USA*, 408-413.
- Samper, J.C. (2008b). Induction of estrus and ovulation: Why some mares respond and others do not. *Theriogenology*, 70, 445-447.
- Sertich P.L., M.S., V.M.D., Dipl. A. C.T., (2005). Management of Reproduction: Horses. In Allen D.G., Anderson D.P., Jeffcott L.B., Quesenberry K.E., Radostits O.M., Reeves P.T. & Wolf A.M. (Eds.). *The Merck Veterinary Manual*. (9ª ed.). (pp. 1759-1771). USA: Merial.
- Shelton J.N. (1990). *Reproductive technology in animal production*. Revue Scientifique et technique (International office of epizootics), 9, 825 - 845.
- Sieme, H., Katila, T. & Klug, E. (2004). Effect of semen collection practices on sperm characteristics before and after storage and on fertility of stallions. *Theriogenology*, 66, 769-784.
- Sousa A. (2008). Reprodução Assistida. *Revista Mundo dos animais*. Acedido em Maio de 2010, disponível em: <http://www.mundodosanimais.com/portal/cavalos/artigos/596-reproducao-assistida.html>
- Squires E.L. & Mckinnon A.O. (1987). Hormone therapy for control of reproduction in mares and stallions. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 3, 81-99.
- Squires E.L., McCue P.M. & Vanderwall D.K. (1999). The current status of equine embryo transfer. *Theriogenology*, 51, 91-104.
- Squires E.L., Carnevale E.M., McCue P.M. & Bruemmer J.E. (2003). Embryo technologies in the horse. *Theriogenology*, 59, 151- 170.

- Squires E.L. (2005). Integration of future biotechnologies into the equine industry. *Animal Reproduction Science*, 89, 187-198.
- Squires E.L. & McCue P.M. (2007). Superovulation in mares. *Animal Reproduction Science*, 99, 1-8.
- Squires E.L. (2008). Hormonal Manipulation of the Mare: A Review. *Journal of Equine Veterinary Science*, 28, 627-634.
- University of Kentucky, College of Agriculture (UK), (1998a). *The Mare: Breeding Soundness Examination & Reproductive Anatomy*. Equine Section, Department of Animal Sciences.
- University of Kentucky, College of Agriculture (UK), (1998b). *The Stallion: Breeding Soundness Examination & Reproductive Anatomy*. Equine Section, Department of Animal Sciences.
- Valera M., Esteves L., Oom M.M. & Molina A. (2000). *La raça equina autóctone puro sangue lusitano: estudo genético dos parâmetros reprodutivos de importância nos esquemas de conservação e melhoramento*. Archives Zootécnicas da Facultad Veterinaria de Córdoba, Espanha, 49, 147-156.
- Vanderwall D.K. & Woods G.L. (2007). Embryo transfer and newer assisted reproductive techniques for horses. In Youngquist R.S. & Threlfall W.R. (Eds.) (2007). *Current Therapy in Large Animal*, (2^a ed.). (pp. 211-219). Missouri, USA: Theriogenology, Saunders.
- Vanderwall D.K. (2008). Early embryonic loss in the mare. *Journal of Equine Veterinary Science*, 28, 691-702.
- Vicente A., Carolino N. & Gama L.T. (2009). *Indicadores demográficos no cavalo lusitano*. Arquivos de zootécnia, 58, 501-504.
- Wood J.L.N., Cardewell J.M., Castillo-Olivares J. & Irwin V. (2007). Transmission of diseases through semen. In Samper, J.C., Pycoc, J.F. & McKinnon, A.O. (Eds.). *Current therapy in equine reproduction*. (2^o ed.). (pp. 266-274). St. Louis, USA: Saunders Elsevier.